



Universidade Federal de São Paulo

**Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e
Farmacêuticas**

**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia da
Sustentabilidade**

Renato Hisashi Okina

**“Desenvolvimento de sensores baseados em nanotubos de
carbono para a determinação de hormônios em água do mar”**

Diadema

2017

Universidade Federal de São Paulo
Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e
Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia da
Sustentabilidade

Renato Hisashi Okina

“Desenvolvimento de sensores baseados em nanotubos de carbono para a determinação de hormônios em água do mar”

Dissertação apresentada, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* Ciência e Tecnologia da Sustentabilidade do Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) – Campus Diadema

Orientador: Dra. Lúcia Codognoto de Oliveira
Coorientador: Dr. Fábio Ruiz Simões

Diadema

2017

Okina, Renato Hisashi

Desenvolvimento de sensores baseados em nanotubos de carbono para a determinação de hormônios em água do mar/ Renato Hisashi Okina. Diadema, 2017. 68 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia da Sustentabilidade) - Universidade Federal de São Paulo - Campus Diadema, 2017.

Orientador: Lúcia Codognoto de Oliveira

Co-Orientador: Fábio Ruiz Simões

1. Eletroquímica. 2. Eletroanalítica. 3. Sensores. 4. Nanotubos de carbono. 5. Estrógenos. I. Desenvolvimento de sensores baseados em nanotubos de carbono para a determinação de hormônios em água do mar.

CDD 546.22



ATA DE REUNIÃO DA COMISSÃO JULGADORA DA DEFESA DE TESE DE MESTRADO

Ao sexto dia do mês de dezembro do ano de dois mil e dezessete, reuniu-se na Sala da Pós-graduação da Unidade José Alencar - Rua São Nicolau, 210 - Centro - Diadema/SP, às 14h00, a Comissão Julgadora para a **DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**, solicitada por **RENATO HISASHI OKINA**, aluno do Programa de Pós-Graduação em **CIENCIA E TECNOLOGIA DA SUSTENTABILIDADE - CAMPUS DIADEMA**, que apresentou dissertação sob o Título: **"Desenvolvimento de Sensores Baseados em Nanotubos de Carbono para a Determinação de Hormônios em Água do Mar"**.

A referida Comissão esteve constituída pelos Professores Doutores:

Titulares:

- **Dra. Claudia do Amaral Razzino (CPF: 284.574.408-02)**

Doutora
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
Universidade do Vale do Paraíba

- **Profa. Dra. Eliana Maíra Valle Akamatu (CPF: 990.483.885-20)**

Professora
Departamento de Química
Universidade Federal de São Paulo

- **Profa. Dra. Sonia Tomie Tanimoto (CPF: 024.170.619-02)**

Professora
Centro de Ciências Exatas, Tecnológicas e Agrárias
Centro Universitário de Maringá

Suplentes:

- **Prof. Dr. Marlon Cavalcante Maynart (CPF: 215.820.798-11)**

Professor
Departamento de Engenharia Ambiental e Sanitária
Centro Universitário SENAC

- **Prof. Dr. Mauro Aquiles La Scalea (CPF: 075.189.728-08)**

Professor
Departamento de Química
Universidade Federal de São Paulo

A presidente da banca, **Profa. Dra. Lúcia Codognoto de Oliveira**, iniciou a sessão dando a palavra ao candidato, que dispôs de vinte a trinta minutos, no máximo, para expor sua tese. A seguir, deu a palavra aos professores para a arguição. Cada examinador dispôs de trinta minutos, no máximo, para arguição, bem como o candidato, para resposta. Tendo o candidato



Universidade Federal de São Paulo
Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia da Sustentabilidade



respondido todas as arguições em tempo hábil, os membros da Banca Examinadora emitiram seus pareceres:

Profs. Drs.:

(Aprovado / Reprovado)

Claudia do Amaral Razzino

Aprovado

Eliana Maíra Valle Akamatu

Aprovado

Sonia Tomie Tanimoto

Aprovado

Em face dos referidos pareceres, a Comissão Julgadora considera **RENATO HISASHI OKINA**, aprovado (Aprovado/Reprovado) a receber o título de MESTRE EM CIÊNCIAS pela UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO. Por estarem de acordo, assinam a presente ata.

Claudia do Amaral Razzino
Dra. Claudia do Amaral Razzino

Eliana Valle
Profa. Dra. Eliana Maíra Valle Akamatu

Sonia Tomie Tanimoto
Profa. Dra. Sonia Tomie Tanimoto

Lúcia Codognoto de Oliveira
Profa. Dra. Lúcia Codognoto de Oliveira

Sugestões e observações:

São Paulo, 06 de dezembro de 2017.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente à Deus, criador dos céus e da terra.

Dedico também à professora Lúcia e ao professor Fábio por toda dedicação e ajuda na condução deste trabalho.

Dedico este trabalho à minha esposa Juliana, aos meus pais Marcos e Tania, e à minha irmã Vivian por todo incentivo e apoio.

AGRADECIMENTOS

- À minha família, por todo apoio, incentivo e educação.
- Aos meus orientadores Lúcia Codognoto e Fábio Simões.
- Aos demais professores do LABEE, Eliana, Mauro e Tiago.
- À todos o colegas e amigos de laboratório, Aymara, Caio (Vitor), Carol, Daisy, Hadassa, Ísis, Karla, Luísa, Pedro, Ronaldo (Fábio) e Thays, por toda companhia, apoio, incentivo e colaboração.
- Aos amigos feitos durante o programa nas matérias cursadas e nos demais laboratórios da UNIFESP.
- À todos os demais amigos feitos desde a graduação na UNIFESP que também fizeram parte desta jornada.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um sensor de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas para determinação dos hormônios estrona, estriol e 17- α -etinilestradiol em água do mar. Utilizando a técnica de voltametria cíclica foi possível observar que os três hormônios em estudo apresentaram voltamogramas característicos de processos irreversíveis em tampão BR 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0. Os potenciais de pico de oxidação foram 0,59 V, 0,57 V e 0,56 V para estrona, estriol e 17- α -etinilestradiol, respectivamente. Ainda em voltametria cíclica também foram feitos o estudo da influência do pH do meio e da variação da velocidade de varredura no processo de oxidação dos três hormônios, o resultados indicaram que o processo de oxidação é próton dependente e controlado pela adsorção. O método de modificação do eletrodo com adições sucessivas de nanotubos de carbono apresentou-se eficiente para um melhor recobrimento da superfície do eletrodo, promovendo um aumento na intensidade do sinal de pico dos hormônios e uma maior resistência à passivação da superfície eletródica. Os parâmetros da voltametria de onda quadrada foram otimizados para o desenvolvimento da metodologia analítica, foram otimizados amplitude da onda quadrada, frequência da onda quadrada e incremento de varredura. Após otimização dos parâmetros as curvas analíticas para os três hormônios foram obtidas, os resultados apresentaram linearidade na faixa de concentração de 1,0x10⁻⁶ mol L⁻¹ a 9,0x10⁻⁶ mol L⁻¹ para estrona e estriol e de 1,0x10⁻⁶ mol L⁻¹ a 4,5x10⁻⁶ mol L⁻¹ para o 17- α -etinilestradiol. O teste de recuperação feito para a estrona em amostra de água do mar apresentou um valor de 74% para a amostra fortificada na concentração de 1,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹, indicando a aplicabilidade da metodologia desenvolvida para quantificar a estrona diretamente na água do mar.

Palavras-chave: eletroquímica, eletroanalítica, sensores, nanotubos de carbono estrógenos.

Abstract

This work aimed de development of a glassy carbon sensor modified with multi-walled carbon nanotubes for determination of estrone, estriol and 17- α -ethinylestradiol in seawater. Using the cyclic voltammetry technique it was possible to observe that the three hormones in study showed voltamograms typical of irreversible process in BR buffer 0.1 mol L⁻¹, pH 7.0. The oxidation potential peak were 0.59 V, 0.57V e 0.56 V, for estrone, estriol and 17- α -ethinylestradiol, respectively. Also in cyclic voltammetry the study of pH of the medium and sweep velocity effect in the oxidation process for the three hormones were made, the results showed that the oxidation process is proton dependent and controlled by adsorption. The electrode modification method with successive additions of carbon nanotubes showed efficiency for a better electrode surface cover, increasing the peak signal intensity of the three hormones and a bigger surface passivation resistance. The square wave voltyammetry parameters were optimized to the analytical method development, square wave amplitude, frequency and scan increment were optimized. After the parameters optimization the analytical curves were obtained for the three hormones, the results presented linearity in the concentration range 1.0x10⁻⁶ mol L⁻¹ to 9.0x10⁻⁶ mol L⁻¹ for estrone and estriol, and 1.0x10⁻⁶ mol L⁻¹ to 4.5 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ for 17- α -ethinylestradiol. The recovery test for estrone in seawater sample showed the value of 74% for spiked sample at the concentration of 1.0 x 10⁻⁶, indicating the applicability of the developed methodology to quantify estrone directly in sea water.

Key-words: electrochemistry, electroanalytical, sensors, carbon nanotubes, strogens.

Índice de Figuras

Figura 1: Localização dos emissários submarinos da Baixada Santista.	16
Figura 2: Imagens aéreas da Baía de Santos.	17
Figura 3: Fórmula estrutural dos hormônios: estrona, estriol e 17- α -etinilestradiol.	19
Figura 4: Reação de oxidação dos estrógenos.	20
Figura 5: Tipos de nanotubos de carbono.	21
Figura 6: Célula eletroquímica de três eletrodos.	26
Figura 7: Localização geográfica do ponto de coleta.	30
Figura 8: Voltamogramas cíclicos dos hormônios estrona (A), estriol (B) e 17- α -etinilestradiol (C). Tampão BR; pH 7,0; concentração $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$; primeiro ciclo.	31
Figura 9: A) Voltamogramas cíclicos da variação do pH do meio para a estrona. B) Potencial de pico da variação do pH do meio para a estrona. C) Intensidade de corrente da variação de pH do meio para a estrona. Tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0 – 12,0; estrona $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	32
Figura 10: A) Voltamogramas cíclicos da variação do pH do meio para o estriol. B) Potencial de pico da variação do pH do meio para o estriol. C) Intensidade de corrente da variação de pH do meio para o estriol. Tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0 – 12,0; estrona $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	33
Figura 11: A) Voltamogramas cíclicos da variação do pH do meio para o 17- α -etinilestradiol. B) Potencial de pico da variação do pH do meio para o 17- α -etinilestradiol. C) Intensidade de corrente da variação de pH do meio para o 17- α -etinilestradiol. Tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0 – 12,0; estrona $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	34
Figura 12: A) Voltamogramas cíclicos da variação da velocidade de varredura da voltametria cíclica para a estrona. B) Intensidade de corrente da variação a velocidade de varredura para a estrona. C) Gráfico $\log(I_p)$ v.s $\log(v)$ da variação da velocidade de varredura para a estrona. Tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0; estrona $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $v = 10 - 300 \text{ mV s}^{-1}$	36
Figura 13: A) Voltamogramas cíclicos da variação da velocidade de varredura da voltametria cíclica para o estriol. B) Intensidade de corrente da variação a velocidade de varredura para o estriol. C) Gráfico $\log(I_p)$ v.s $\log(v)$ da variação da	

velocidade de varredura para o estriol. Tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ ; pH 7,0; estrona 5,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ ; v = 10 – 200 mV s ⁻¹	37
Figura 14: A) Voltamogramas cíclicos da variação da velocidade de varredura da voltametria cíclica para o 17- α -etinilestradiol. B) Intensidade de corrente da variação a velocidade de varredura para o 17- α -etinilestradiol. C) Gráfico log (I _p) v.s log (v) da variação da velocidade de varredura para o 17- α -etinilestradiol. Tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ ; pH 7,0; estrona 5,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ ; v = 10 – 300 mV s ⁻¹	38
Figura 15: Funcionalização dos nanotubos de carbono (MWCNT – MWCNT/COO).	39
Figura 16: Imagem de FTIR das amostras de MWCNT e MECNT/COO em pastilhas de KBr.	40
Figura 17: Imagem de MEV do filme de MWCNT/COO depositado sobre substrato de ITO.	40
Figura 18: Voltamogramas cíclicos dos hormônios sobre os eletrodos modificado e sem modificar. Tampão BR; pH 7,0; concentração 5,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ ; v = 50 mV s ⁻¹	41
Figura 19: Avaliação do efeito do número de adições da solução de MWCNTs (A – Voltamogramas; B – Intensidade). Tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ , estrona 5,0 x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ . Amplitude – 50 mV, Frequência 250 mV, Incremento de varredura – 4 mV.	42
Figura 20: Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a estrona. Tampão BR pH 7,0; Concentração = 1,0x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	44
Figura 21: Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o estriol. Tampão BR pH 7,0; Concentração = 1,0x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	45
Figura 22: Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o estriol. Tampão BR pH 7,0; Concentração = 1,0x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	46
Figura 23: Intensidade de corrente de pico em função da variação dos parâmetros da onda quadrada para a estrona (dados retirados da Figura 20).	47
Figura 24: Intensidade de corrente de pico em função da variação dos parâmetros da onda quadrada para o estriol (dados retirados da Figura 21).....	48
Figura 25: Intensidade de corrente de pico em função da variação dos parâmetros da onda quadrada para o 17- α -etinilestradiol (dados retirados da Figura 22).....	50
Figura 26: A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a estrona em função da variação da amplitude.B) Variação da corrente de pico em função da amplitude	

da onda quadrada. Tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0; estrona $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; Amplitude = 10 – 100 mV, Frequência = 100 Hz, Incremento de varredura = 2 mV.

.....51

Figura 27: A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o estriol em função da variação da amplitude. B) Variação da corrente de pico em função da amplitude da onda quadrada. Tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0; estriol $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; Amplitude = 10 – 100 mV, Frequência = 100 Hz, Incremento de varredura = 2 mV.

.....52

Figura 28: A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o 17- α -etinilestradiol em função da variação da amplitude. B) Variação da corrente de pico em função da amplitude da onda quadrada. Tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0; 17- α -etinilestradiol $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; Amplitude = 10 – 100 mV, Frequência = 100 Hz, Incremento de varredura = 2 mV.....52

Figura 29: A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a estrona em função da variação da frequência da onda quadrada. B) Variação da intensidade da corrente de pico em função da frequência da onda quadrada. Tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0; estrona $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; Amplitude = 50 mV, Frequência = 25 – 250 Hz, Incremento de varredura = 2 mV.53

Figura 30: A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o estriol em função da variação da frequência da onda quadrada. B) Variação da intensidade da corrente de pico em função da frequência da onda quadrada. Tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0; estriol $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; Amplitude = 50 mV, Frequência = 25 – 250 Hz, Incremento de varredura = 2 mV.53

Figura 31: A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o 17- α -etinilestradiol em função da variação da frequência da onda quadrada. B) Variação da intensidade da corrente de pico em função da frequência da onda quadrada. Tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0; 17- α -etinilestradiol $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; Amplitude = 50 mV, Frequência = 25 – 250 Hz, Incremento de varredura = 2 mV.53

Figura 32: A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a estrona em função da variação do incremento de varredura da onda quadrada. B) Variação da intensidade da corrente de pico em função do incremento de varredura da onda quadrada. Tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0; estrona $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; Amplitude = 50 mV, Frequência = 100 Hz, Incremento de varredura = 2 – 10 mV.54

Figura 33: A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o estriol em função da variação do incremento de varredura da onda quadrada. B) Variação da intensidade da corrente de pico em função do incremento de varredura da onda quadrada. Tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ ; pH 7,0; estriol 5,0 x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ ; Amplitude = 50 mV, Frequência = 100 Hz, Incremento de varredura = 2 – 10 mV	55
Figura 34: A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o 17- α -etinilestradiol em função da variação do incremento de varredura da onda quadrada. B) Variação da intensidade da corrente de pico em função do incremento de varredura da onda quadrada. Tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ ; pH 7,0; 17- α -etinilestradiol 5,0 x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ ; Amplitude = 50 mV, Frequência = 100 Hz, Incremento de varredura = 2 – 10 mV .	55
Figura 35: A) Voltamogramas de onda quadrada para a estrona sobre o eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono. B) Curva analítica da estrona. Tampão BR; pH 7,0; Amplitude = 50 mV; Frequência = 250 Hz; Incremento de varredura = 2 mV.....	57
Figura 36: A) Voltamogramas de onda quadrada para o estriol sobre o GCE/MWCNT. B) Curva analítica do estriol. Tampão BR; pH 7,0; Amplitude = 50 mV; Frequência = 250 Hz; Incremento de varredura = 2 mV	58
Figura 37: A) Voltamogramas de onda quadrada para o 17- α -etinilestradiol sobre o GCE/MWCNT. B) Curva analítica do 17- α -etinilestradiol. Tampão BR; pH 7,0; Amplitude = 50 mV; Frequência = 250 Hz; Incremento de varredura = 2 mV.	58
Figura 38: A) Voltamogramas de onda quadrada para a estrona em tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ , pH 8,0 sobre o GCE/MWCNT. B) Voltamogramas de onda quadrada para a estrona em água do mar sobre o GCE/MWCNT. C) Curva analítica da estrona em tampão BR e em água do mar. Amplitude = 50 mV; Frequência = 250 Hz; Incremento de varredura = 2 mV.....	60
Figura 39: A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a determinação da estrona em água do mar. B) Curva analítica da estrona em amostra de água do mar. Amplitude = 50 mV; Frequência = 250 Hz; Incremento de varredura = 2 mV.	62

Índice de Tabelas

Tabela 1: Lista de reagentes utilizados e sua procedência.....	25
Tabela 2: Parâmetros da voltametria da onda quadrada para os hormônios em estudo sobre o eletrodo de carbono vítreo sem modificação.	51
Tabela 3: Parâmetros da voltametria da onda quadrada otimizados para a determinação dos hormônios estrona, estriol e 17- α -etinilestradiol sobre o GCE/MWCNT.....	56
Tabela 4: Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para os hormônios em estudo, utilizando diferentes métodos eletroanalíticos.	59
Tabela 5: Resultados obtidos das curvas analíticas para a estrona em tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ e em água do mar, utilizando o GCE/MWCNT.	60
Tabela 6: ANOVA para as curvas obtidas no tampão BR e na amostra de água do mar para a estrona.	61
Tabela 7: Resultado da curva de recuperação da estrona em água do mar, utilizando o GCE/MWCNT.....	62

Sumário

1. Introdução	15
1.1 Considerações Gerais	15
1.2 Compostos de interesse para o presente estudo	19
1.3 Síntese da Bibliografia Fundamental	21
2. Objetivos	24
3. Parte Experimental	25
3.1 Reagentes e Soluções	25
3.2 Instrumentação	26
3.3 Metodologia	27
3.3.1 Limpeza do eletrodo	27
3.3.2 Modificação do eletrodo de carbono vítreo	27
3.3.3 Estudo da variação do pH do meio	28
3.3.4 Estudo da variação da velocidade de varredura	28
3.3.5 Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada	29
3.3.6 Curva analítica	29
3.3.7 Amostras de água do mar	29
4. Resultados e Discussão	31
4.1 Estudo da variação do pH do meio	32
4.2 Variação da velocidade de varredura	35
4.3 Modificação do eletrodo	39
4.4 Otimização dos parâmetros da voltametria da onda quadrada	43
4.5 Curva Analítica	57
5. Conclusões	63
6. Referências	65

1. Introdução

1.1 Considerações Gerais

Há um grande interesse no monitoramento da qualidade ambiental, seja a qualidade do ar, águas superficiais, águas subterrâneas, ambientes marinhos e solo. O monitoramento sistemático serve como base de dados para avaliação temporal e espacial da qualidade ambiental, seus resultados orientam medidas de políticas públicas visando o controle e a remediação da poluição.

O estado de São Paulo conta com uma rede de monitoramento da qualidade das águas composta por 449 pontos distribuídos pelos principais rios e reservatórios (Rede Básica), 62 pontos em zonas estuarinas e no Oceano Atlântico (Rede Costeira) e 13 estações de monitoramento automático da qualidade de água administradas pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). A Companhia conta ainda com 165 pontos distribuídos pelos 15 municípios que constituem a costa do litoral paulista e 31 pontos em rios e reservatórios para o monitoramento das condições de balneabilidade^(1,2).

Muitas atividades humanas ocorrem na região costeira, turismo, esportes náuticos pesca e maricultura, navegação comercial, etc. Atividades que requerem diferentes graus de qualidade da água do mar mas também podem causar impactos no meio marinho. Os principais tipos de poluição em águas costeiras são: esgotos sanitários, derramamentos de petróleo e efluentes industriais^(1,2).

A poluição fecal, causada pelo despejo de esgotos domésticos é a mais comum, sendo encontrada em todas as regiões do litoral paulista. Os derrames de petróleo são relativamente localizados em regiões com maior tráfego de navios petroleiros, como nos portos de Santos e São Sebastião. Já a poluição industrial ocorre em regiões com a presença de parques industriais^(1,2).

Quando a população existente nos municípios do litoral é acrescida pelo grande número de turistas em épocas de férias e feriados, provoca-se um aumento considerável da quantidade de esgoto doméstico gerado. Este esgoto chega ao oceano por meio de contribuições difusas de corpos d'água, visto a deficiência da coleta em alguns municípios ou por fontes pontuais constituídas

por emissários submarinos. O aporte de esgoto no meio gera diversos impactos ao meio, contaminação microbiológica, acréscimo de matéria orgânica, aumento da turbidez e o enriquecimento por nutrientes⁽³⁾.

A maioria dos emissários submarinos no Brasil encontra-se no Estado de São Paulo, o esgoto coletado passa por uma estação de pré-condicionamento constituída por um gradeamento, peneiras finas e processo de cloração antes do lançamento ao mar. Não há qualquer tipo de tratamento primário, conta-se apenas com a capacidade de diluição e autodepuração do mar para realizar a degradação do esgoto⁽³⁾. Na Figura 1 encontram-se os emissários submarinos localizados na Baixada Santista.

Figura 1: Localização dos emissários submarinos da Baixada Santista.



Fonte: CETESB⁽³⁾

Em imagens aéreas é possível observar a pluma de contaminação na zona de mistura da descarga do emissário de Santos (Figura 2).

Figura 2: Imagens aéreas da Baía de Santos.



Fonte: Google Imagens⁽⁴⁾.

Estudos na literatura confirmam a presença de diversos poluentes em ambientes aquáticos e na descarga de estações de tratamento de efluentes (ETE). Estes poluentes, ditos poluentes emergentes (EPs), do inglês “emerging pollutants”, são produtos farmacêuticos, hormônios, produtos de higiene, pesticidas, entre outros⁽⁵⁾.

Estes compostos não se apresentam naturalmente no meio ambiente, indicando atividade antrópica no meio, principalmente o descarte irregular de esgoto doméstico e industrial. Os processos de tratamento de efluentes convencionais não eliminam com eficiência estes poluentes gerando potencial impacto ao meio ambiente e à saúde dos seres vivos⁽⁶⁾.

Dentro da classe dos poluentes emergentes estão os disruptores endócrinos (EDCs), do inglês “endocrine disruptor compounds”, estes compostos podem agir causando desordem no sistema endócrino, levando a problemas de desenvolvimento, reprodução e até câncer. Mesmo em baixas concentrações os EDCs podem causar uma série de efeitos nos organismos aquáticos como infertilidade, feminização e anomalias nos órgãos reprodutivos. Assim, é essencial monitorar a presença de EDCs em águas naturais para a proteção dos ecossistemas aquáticos⁽⁷⁾.

Os estrógenos naturais ou sintéticos, componentes de fármacos e excretados na urina humana⁽⁸⁾, estão na lista de substâncias classificadas como EDCs. Os estrógenos naturais (estrone e 17- β -estradiol) e o sintético (17- α -etinilestradiol) são responsáveis pela maior parte da atividade estrogênica detectada em ETEs do Reino Unido^(9,10). A atividade estrogênica

também foi detectada em ETES da Alemanha^(11,12) e Suíça⁽¹³⁾. Estrona, 17- β -estradiol e estriol foram detectados no efluente de entrada de ETE do Japão⁽¹⁴⁾, a estrona e o 17- β -estradiol ainda foram encontradas na saída do processo de tratamento.

O monitoramento da presença de EDCs no meio ambiente tem sido realizado em uma grande variedade de estudos, entretanto, os métodos analíticos utilizados são em geral baseados em métodos cromatográficos associados à detectores de UV-VIS, espectrometria de massa, fluorescência, entre outros^(14,15), os quais são sensíveis e seletivos, mas laboriosos e relativamente caros.

A atividade dos EDCs também pode ser avaliada por métodos ecotoxicológicos, revelando a atividade mutagênica e/ou estrogênica comparada ao efeito de uma substância de referência^(16,17).

O desenvolvimento de novos materiais e novas metodologias para o monitoramento de EDCs e outros poluentes ambientais tem fundamental importância, principalmente quando há a possibilidade da análise *in-situ* e até a criação de sistema de monitoramento remoto *on-line*, obtendo-se desta forma uma amostragem continua ao longo da escala temporal.

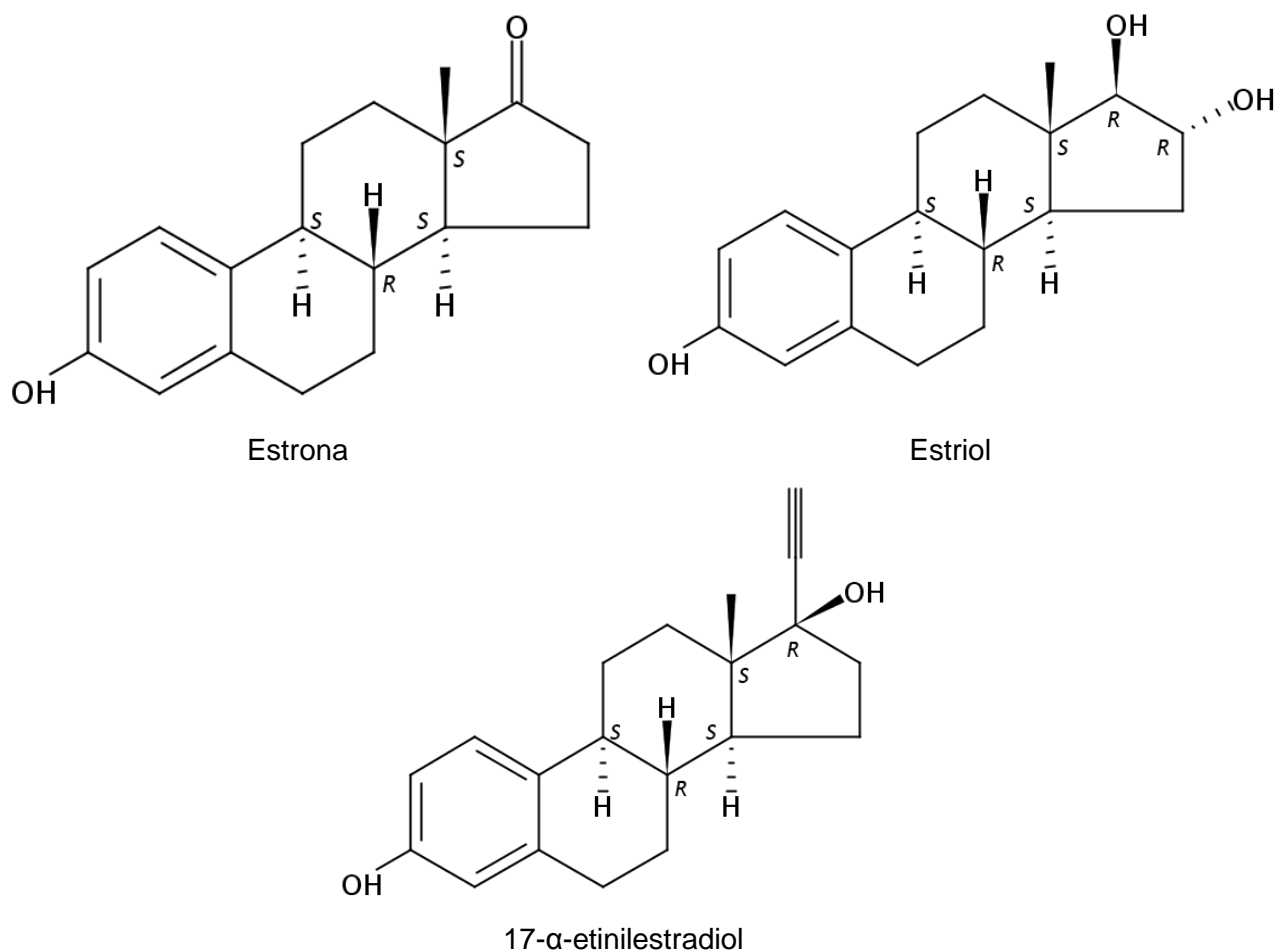
Os métodos eletroanalíticos apresentam diversas vantagens para determinação de contaminantes ambientais, equipamentos de menor custo, análises mais rápidas e a não utilização de solventes orgânicos. As técnicas eletroanalíticas tem sido amplamente utilizadas para determinação qualitativa, quantitativa e para degradação de diferentes analitos em meio aquoso.

A modificação de eletrodos tem sido cada vez mais estudada visando o desenvolvimento de sensores com maior sensibilidade e seletividade. Adicionalmente, aparece como uma boa alternativa para determinação de substancias que adsorvem na superfície do eletrodo de trabalho.

1.2 Compostos de interesse para o presente estudo

Neste trabalho os compostos selecionados para estudo foram os hormônios estrona (E1), estriol (E3), hormônios naturais e o 17- α -etinilestradiol (EE2), hormônios sintético, compostos cujas formulas estruturais estão apresentadas na Figura 3.

Figura 3: Fórmula estrutural dos hormônios: estrona, estriol e 17- α -etinilestradiol.



Os hormônios estradiol, estrona e estriol são os três estrógenos principais produzidos pelo corpo em ordem de atividade. Sendo suas concentrações no organismo variáveis em função do estágio de desenvolvimento do indivíduo (pré-puberdade, puberdade, ciclo menstrual, gravidez e menopausa)^(18,19).

A estrona é produzida nos ovários a partir da androstenediona também a partir do metabolismo do estradiol e é o principal hormônio na fase da menopausa⁽¹⁸⁾.

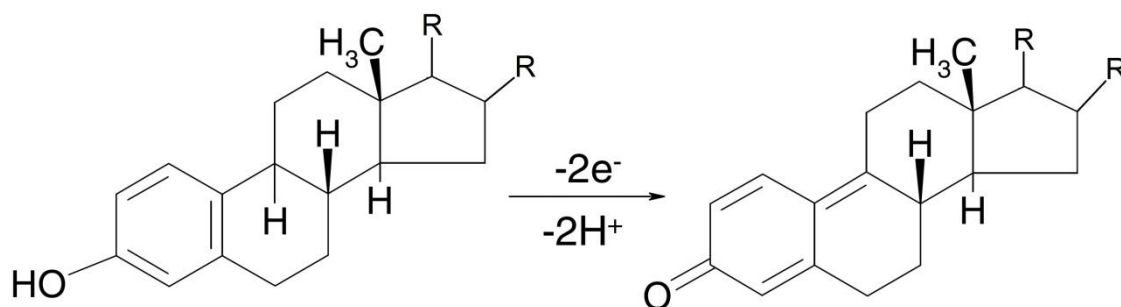
O estriol é produzido principalmente pelas células trofoblásticas da placenta pela metabolização de intermediários esteroides formados pelas adrenais, se tornando o hormônio predominante durante a gravidez⁽¹⁹⁾. Também é muito utilizado para reposição hormonal na menopausa em formulações de cremes.

O 17- α -etinilestradiol é o estrógeno sintético mais utilizado para reposição hormonal e em pílulas anticoncepcionais⁽²⁰⁾.

Os três compostos possuem estruturas químicas muito semelhantes sendo diferenciados apenas pelos diferentes grupos funcionais carbonila, hidroxila e etinil, localizados nos carbonos 16 e 17 do hormônios.

O mecanismo de reação proposto sugere que a reação de oxidação destes hormônios ocorrem no grupo hidroxila do anel aromático, envolvendo a transferência de dois prótons e dois elétrons^(21,22), como mostrado na Figura 4.

Figura 4: Reação de oxidação dos estrógenos.



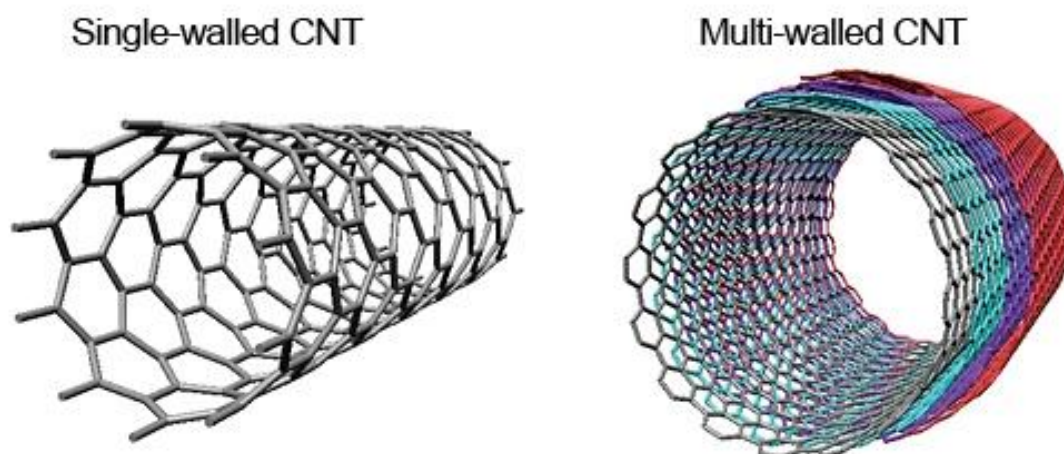
Fonte: Brocenschi (2013)⁽²²⁾.

1.3 Síntese da Bibliografia Fundamental

Dentre os materiais utilizados para modificação de eletrodos no desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos merecem destaque os nanotubos de carbono.

Nanotubos de carbono (CNT) foram descobertos por Iijima⁽²³⁾ utilizando o método de evaporação por descarga elétrica, similar ao método utilizado para a síntese do fulereno. Os nanotubos de carbono podem se apresentar em dois tipos: nanotubos de parede simples (SWCNTs), do inglês single-walled carbon nanotubes e nanotubos de paredes múltiplas (MWCNTs) do inglês multi-walled carbon nanotubes^(24,25) (Figura 5). As paredes dos nanotubos de carbono não são reativas, utiliza-se a funcionalização para se gerar grupos funcionais em suas bordas (-COOH, -OH, -CO)⁽²⁶⁾.

Figura 5: Tipos de nanotubos de carbono.



Fonte: Google Imagens(4).

As técnicas eletroquímicas tem sido bastante estudadas como ferramenta analítica para diversos compostos inclusive estrógenos, fazendo-se do uso de eletrodos de diferentes tipos, modificações, etc.

Asadian *et al.* desenvolveram um eletrodo de carbono vítreo (GCE) modificado com nanotubos de carbono para determinação eletroquímica do metrotrezato utilizando as voltametrias cíclica e de pulso diferencial. Foi avaliado o efeito da presença do ácido ascórbico, dopamina e ácido úrico na

aplicação do método em amostras biológicas (sangue e urina). Obteve-se excelentes porcentagens de recuperação confirmadas por espectroscopia UV-Vis e HPLC⁽²⁷⁾.

Utilizando a técnica da voltametria da onda quadrada Perez *et al.* desenvolveram uma metodologia para a determinação do hormônio 17- α -etinilestradiol em água da represa Billings, importante reservatório de água de São Paulo, alimentado por diversos rios da região metropolitana, cercado por diversos bairros e indústrias que contribuem para a carga de contaminantes⁽²⁸⁾.

Sun *et al.* utilizaram um eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNTs para avaliar o efeito catalítico na oxidação da estrona, estradiol e estriol, observando um aumento na intensidade do sinal de oxidação dos hormônios. A interferência de componentes da urina na detecção dos hormônios também foi avaliada⁽²⁹⁾.

Utilizando uma modificação de nanotubos de carbono e partículas de platina em eletrodo de carbono vítreo Lin *et al.* investigaram um método para determinação dos estrógenos naturais estradiol, estrona e estriol. O método desenvolvido apresentou resultados de recuperação satisfatórios para a determinação de estrógenos em plasma sanguíneo confirmados por dados clínicos obtidos pelo método ELISA⁽³⁰⁾.

Pavinatto *et al.* combinou a modificação de MWCNTs com quitosana em um eletrodo de óxido de estanho dopado com flúor (FTO) para detecção eletroquímica do 17- α -etinilestradiol, observando um sinal que antes não era observado com o eletrodo sem modificação⁽³¹⁾.

Com um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas, Sierra-Rosales *et al.* determinaram eletroquimicamente a presença de corantes alimentícios em bebidas refrigerantes⁽³²⁾.

Yang *et al.* utilizaram um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados com vermelho do

congo para determinação da estrona. Também foi avaliado o efeito da presença de surfactantes no meio na intensidade do sinal do hormônio. Observou-se que a combinação das propriedades dos nanotubos de carbono e da presença de surfactante proporcionou uma alta sensibilidade para o método de determinação da estrona e ainda uma boa eficiência na recuperação⁽³³⁾.

Palazzo *et al.* utilizaram um eletrodo de carbono vítreo (GCE) que foi modificado pela deposição de MWCNTs funcionalizados com ácido carboxílico que foi usado como sensor para determinação do pesticida organofosforado fenitrothion em amostras de chá de maçã. O método de modificação do eletrodo foi otimizado utilizando-se a adição e subsequente evaporação de alíquotas sucessivas, mais diluídas, da dispersão dos MWCNTs em etanol, melhorando o recobrimento do substrato do GCE. Foi observado que os MWCNTs aumentaram significativamente os valores de intensidade de corrente de pico bem como protegeram o substrato contra a contaminação do pesticida na superfície do eletrodo modificado⁽³⁴⁾.

As técnicas de modificação de eletrodos com nanotubos de carbono apresentam uma grande eficiência para a determinação analítica, aumentando significativamente a sensibilidade da análise com um simples processo de adsorção física da modificação, tornando este tipo de modificação um dos métodos mais simples para o desenvolvimento de sensores. Assim, é promissor o desenvolvimento de sensores baseados em nanotubos de carbono e da metodologia de determinação dos hormônios estrona, estriol e 17- α -etinilestradiol diretamente em água do mar, sem qualquer tipo de tratamento químico da amostra.

2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de sensores baseados em nanotubos de carbono para a determinação dos estrógenos estrona, estriol e 17- α -etinilestradiol em água do mar.

Este objetivo geral pode ser detalhado em:

- Avaliação da resposta eletroquímica dos hormônios sobre o eletrodo de carbono vítreo (GCE) e sobre o eletrodo modificado com os nanotubos de carbono (GCE/MWCNT).
- Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação dos hormônios em água do mar utilizando o eletrodo modificado.
- Aplicação da metodologia desenvolvida para a determinação do hormônio estrona em água do mar utilizando o eletrodo modificado.

3. Parte Experimental

3.1 Reagentes e Soluções

Os reagentes utilizados foram de grau analítico (Tabela 1).

Tabela 1: Lista de reagentes utilizados e sua procedência.

Reagente	Procedência
Estrona	Sigma-Aldrich
Estriol	Sigma-Aldrich
17- α -etinilestradiol	Sigma-Aldrich
Acetonitrila	Synth
Ácido Acético	Sigma-Aldrich
Ácido Bórico	Synth
Ácido Fosfórico	Sigma-Aldrich
Ácido Sulfúrico	Synth
Cloreto de Potássio	Merk
Hidróxido de Sódio	Merk
Etanol	Synth
Alumina	Arotec
MWCNT	Cheaptubes Incorporation®

As soluções dos hormônios foram preparadas utilizando o método de dissolução do reagente em acetonitrila na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, e por meio de diluição preparou-se as soluções de hormônios na concentração de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

O eletrólito suporte utilizado foi o tampão Britton-Robinson (BR) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido acético, $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido bórico, $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido fosfórico e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl)⁽³⁶⁾, conhecido por sua capacidade tamponante em uma ampla faixa de pH.

O ajuste do pH das soluções tampão foi realizado pela adição de alíquotas de hidróxido de sódio (NaOH) $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, formando a escala de pH de 2,0 à 12,0. A solução de ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada em meio aquoso para a limpeza dos eletrodos.

Todas as soluções aquosas foram preparadas com água ultrapura do sistema Milli-Q da Milipore Corporation.

3.2 Instrumentação

As medidas voltamétricas foram realizadas utilizando-se o potenciostato/galvanostato AUTOLAB[®] PGSTAT128 (Ecochemie, Holanda), gerenciado pelo programa GPES 4.9.

A célula eletroquímica utilizada para os estudos voltamétricos dos hormônios foi uma célula convencional de compartimento único de três eletrodos (Figura 6) sendo, eletrodo de trabalho (GCE) e (GCE/MWCNT), eletrodo de referência ($\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$) e eletrodo auxiliar de (Platina).

Figura 6: Célula eletroquímica de três eletrodos.



Os reagentes sólidos foram pesados em balança analítica (Shimadzu AUW220D). O ajuste de pH das soluções foi feito por meio do pH-metro de bancada 827lab da Metrhone com eletrodo combinado de vidro calibrado com soluções padrão de pH 4,0 e 7,0.

A dispersão dos nanotubos de carbono foi efetuada utilizando-se um ultrassom de banho. Equipamentos alocados no laboratório de eletroquímica e eletroanalítica da Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema.

3.3 Metodologia

3.3.1 Limpeza do eletrodo

A limpeza do eletrodo foi conduzida de duas formas diferentes, dependendo da condição do eletrodo.

Para o eletrodo sem modificação efetuou-se a limpeza por meio de polimento com solução de alumina em superfície de esparadrapo de algodão seguido de polimento com alumina em feltro de polimento metalográfico, enxágue com água destilada e agitação no ultrassom com etanol seguidas de cinco varreduras de voltametria cíclica para a verificação da condição do eletrodo.

A limpeza do eletrodo modificado foi conduzida por meio da aplicação de potencial de 0,85 V por 90 segundos em solução de H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} seguida de cinco varreduras de voltametria cíclica na mesma solução, após enxágue efetuou-se cinco varreduras de voltametria cíclica para a verificação da condição do eletrodo.

3.3.2 Modificação do eletrodo de carbono vítreo

Para a modificação do eletrodo utilizou-se os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) da Cheaptubes Incorporation® com 93% de pureza, 40 nm de diâmetro e espessura de 5 a 20 nm, obtidos por deposição química a vapor (CVD).

Os nanotubos foram previamente tratados em uma mistura de ácido nítrico e ácido sulfúrico na proporção 1:3, a qual foi mantida a quente (70°C) e sob agitação magnética por 3 horas. Os nanotubos funcionalizados em ácido (MWCNT/COOH) passaram pelo processo de lavagens sucessivas com água destilada ultrapura seguidas de centrifugação até que a solução sobrenadante se tornasse neutra. Os nanotubos funcionalizados passaram por secagem em estufa até a eliminação completa da umidade e depois macerados em pistilo de quartzo.

Estes nanotubos foram caracterizados por meio de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) em pastilha de

KBr. Os nanotubos foram macerados em KBr e prensados para a formação da pastilha analisada do FTIR.

Os nanotubos de carbono funcionalizados (MWCNT/COO) foram dispersos em etanol na proporção de 1 mg de nanotubos para 5mL de etanol. Com o auxílio de uma micropipeta procedeu-se a cobertura da superfície do eletrodo previamente limpo. A cobertura do eletrodo foi feita por meio de três gotejamentos de 5 μL da dispersão de nanotubos de carbono alternados de secagem à temperatura ambiente a cada gota depositada.

Esta modificação foi caracterizada por meio da microscopia de varredura eletrônica (MEV) do filme de nanotubos depositado sobre um substrato de vidro recoberto com óxido de índio (ITO), no JSM-6610LV da Jeol.

3.3.3 Estudo da variação do pH do meio

O estudo da influência do pH do meio foi efetuado para a escala de pH de 2,0 à 12,0. Adicionou-se à célula eletroquímica 10 mL da solução tampão BR 0,1 mol L^{-1} e 500 μL da solução do hormônio em estudo de concentração $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} , resultando em uma concentração de hormônio na célula de $5,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} . Procedeu-se a desoxigenação da mistura por borbulhamento de nitrogênio durante 30 segundos, em seguida efetuou-se a varredura por voltametria cíclica (CV) no intervalo de potencial de 0,0 V à 1,2 V.

Para cada valor de pH na escala de 2,0 à 12,0 colocou-se uma nova mistura tampão/analito na célula eletroquímica e antes de cada medida procedeu-se a limpeza da superfície do eletrodo sem modificação conforme descrito na seção 3.3.1, este estudo foi efetuado com o eletrodo de carbono vítreo sem modificação.

3.3.4 Estudo da variação da velocidade de varredura

Os estudos da variação da velocidade de varredura da voltametria cíclica foram realizados em tampão BR pH 7,0 no intervalo de velocidade de 10 mV s^{-1} à 300 mV s^{-1} sendo a concentração de hormônio na célula eletroquímica de $5,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} . Este estudo foi efetuado com o eletrodo de carbono vítreo sem

modificação e antes de cada medida procedeu-se a limpeza da superfície do eletrodo sem modificação conforme descrito na seção 3.3.1.

3.3.5 Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada

Os parâmetros que envolvem a voltametria de onda quadrada, como: amplitude da onda quadrada, frequência da onda quadrada e incremento de varredura foram otimizados. As medidas foram efetuadas em tampão BR pH 7,0, sendo a concentração de hormônio na célula eletroquímica de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para o teste com o eletrodo sem modificação e de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para o teste com o eletrodo modificado.

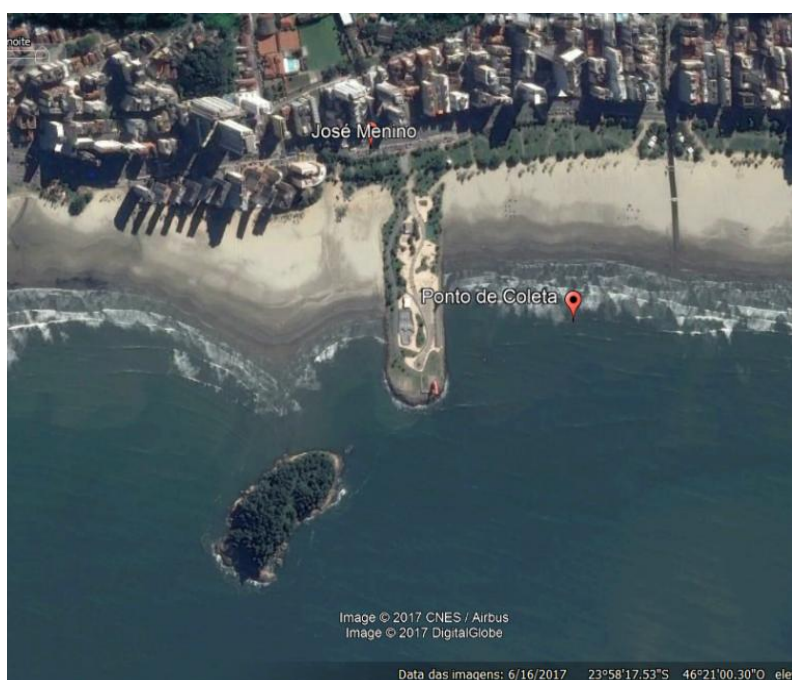
3.3.6 Curva analítica

As curvas analíticas dos hormônios foram obtidas em tampão BR pH 7,0 adicionando-se alíquotas sucessivas de hormônio variando-se a concentração na célula eletroquímica de $1,0 \times 10^{-6}$ à $9,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para a estrona, de $1,0 \times 10^{-6}$ à $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para o estriol e de $1,0 \times 10^{-6}$ à $4,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para o 17- α -etinilestradiol, utilizando-se o eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono GCE/MWCNT.

3.3.7 Amostras de água do mar

A avaliação da potencialidade do método proposto foi testada na determinação de estrona em água do mar que foi coletada na praia do José Menino – Santos (Figura 7).

Figura 7: Localização geográfica do ponto de coleta.



Fonte: Google Earth⁽³⁷⁾

O ponto de coleta foi localizado equidistante da estrutura exposta do emissário de Santos e do Canal 1, nas coordenadas: Latitude 23° 58'16,26"S e Longitude 46°20'51,07"O. Amostra foi coletada na linha de costa, entre as ondas em garrafa plástica. A amostra foi tratada em laboratório por meio de filtração simples para a retirada de areia e material particulado tendo seu pH aferido no valor de 8,0.

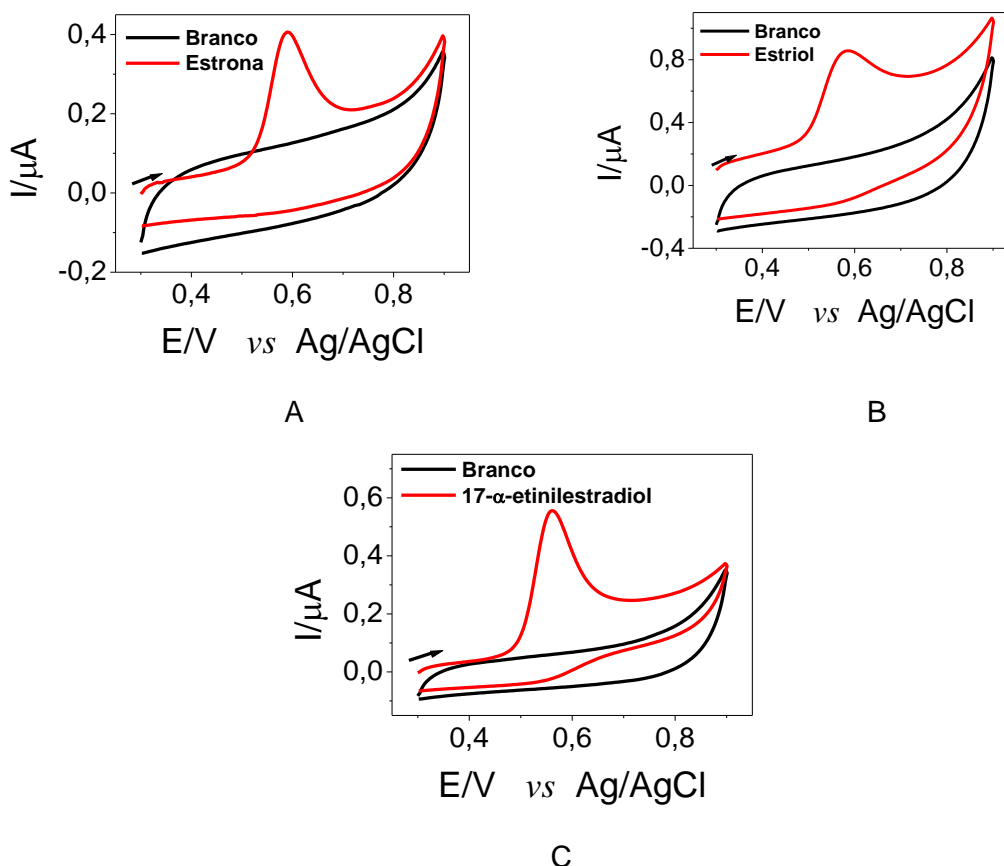
A água do mar foi utilizada como eletrólito suporte (pH 8,0) para a obtenção de uma curva analítica da estrona, adicionando-se alíquotas sucessivas da solução padrão de estrona variando-se a concentração na célula eletroquímica de $1,0 \times 10^{-6}$ à $7,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Construiu-se outra curva analítica em tampão BR pH 8,0 para se avaliar a influencia da matriz na análise.

O teste de recuperação da estrona foi efetuado utilizando-se o método de adição de padrão, construiu-se a curva analítica sobre a amostra de água do mar contaminada intencionalmente com estrona no valor de concentração de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

4. Resultados e Discussão

Inicialmente verificou-se a existência do sinal eletroquímico dos hormônios estrona, estriol e 17- α -etinilestradiol sobre o eletrodo de carbono vítreo sem modificação em tampão BR pH 7,0. Utilizando a técnica de voltametria cíclica obteve-se os voltamogramas apresentados na Figura 8, pode-se observar um pico de oxidação para a estrona, estriol e 17- α -etinilestradiol nos potenciais de 0,59 V, 0,57V e 0,56 V, respectivamente, com características de processos irreversíveis, visto que não há sinal de redução na volta da varredura. Estes valores são condizentes com os encontrados na literatura na faixa de pH 5,0 à pH 8,0^(26,28).

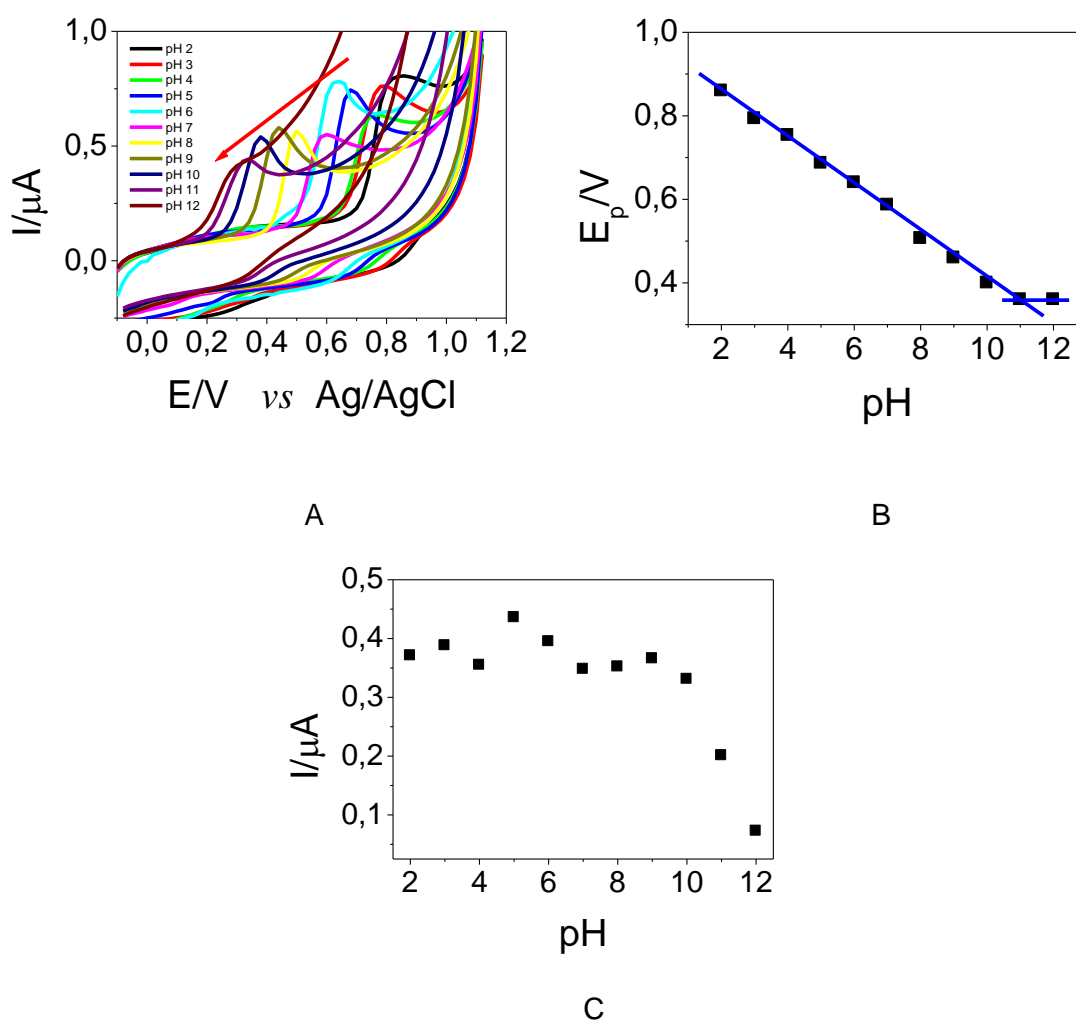
Figura 8: Voltamogramas cíclicos dos hormônios estrona (A), estriol (B) e 17- α -etinilestradiol (C). Tampão BR; pH 7,0; concentração $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$; primeiro ciclo.



4.1 Estudo da variação do pH do meio

A influencia do pH do meio no processo de oxidação da estrona foi avaliada utilizando-se a voltametria cíclica no intervalo de pH de 2,0 a 12,0 em tampão BR pH 7,0 e concentração de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de hormônio na célula eletroquímica (Figura 9).

Figura 9: A) Voltamogramas cíclicos da variação do pH do meio para a estrona. B) Potencial de pico da variação do pH do meio para a estrona. C) Intensidade de corrente da variação de pH do meio para a estrona. Tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0 – 12,0; estrona $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



Observa-se que o potencial de oxidação da estrona se desloca para regiões de potencial menos positivo (Figura 9A) e decresce com o aumento do pH do meio, apresentando duas regiões de linearidade que se interceptam em 10,8 (Figura 9B), valor correspondente ao pK_a aparente do grupo hidroxila do anel aromático da estrona, o qual está próximo do observado na literatura que é de aproximadamente 10,34⁽³⁸⁾, a oxidação deste grupo depende de sua

acidez e do pH do meio uma vez que a oxidação ocorre com a perda de um átomo de hidrogênio(39). A intensidade da corrente de pico (Figura 9C) é aparentemente constante entre os pH 2,0 e 8,0, diminuindo intensamente em pH mais altos, evidenciando a dependência de protonação (Figura 9C).

O estudo da variação do pH do meio também foi realizado para o estriol (Figura 10) e para o 17- α -etinilestradiol (Figura 11).

Figura 10: A) Voltamogramas cíclicos da variação do pH do meio para o estriol. B) Potencial de pico da variação do pH do meio para o estriol. C) Intensidade de corrente da variação de pH do meio para o estriol. Tampão BR 0,1 mol L⁻¹; pH 2,0 – 12,0; estrona 5,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹; $\nu = 50$ mV s⁻¹.

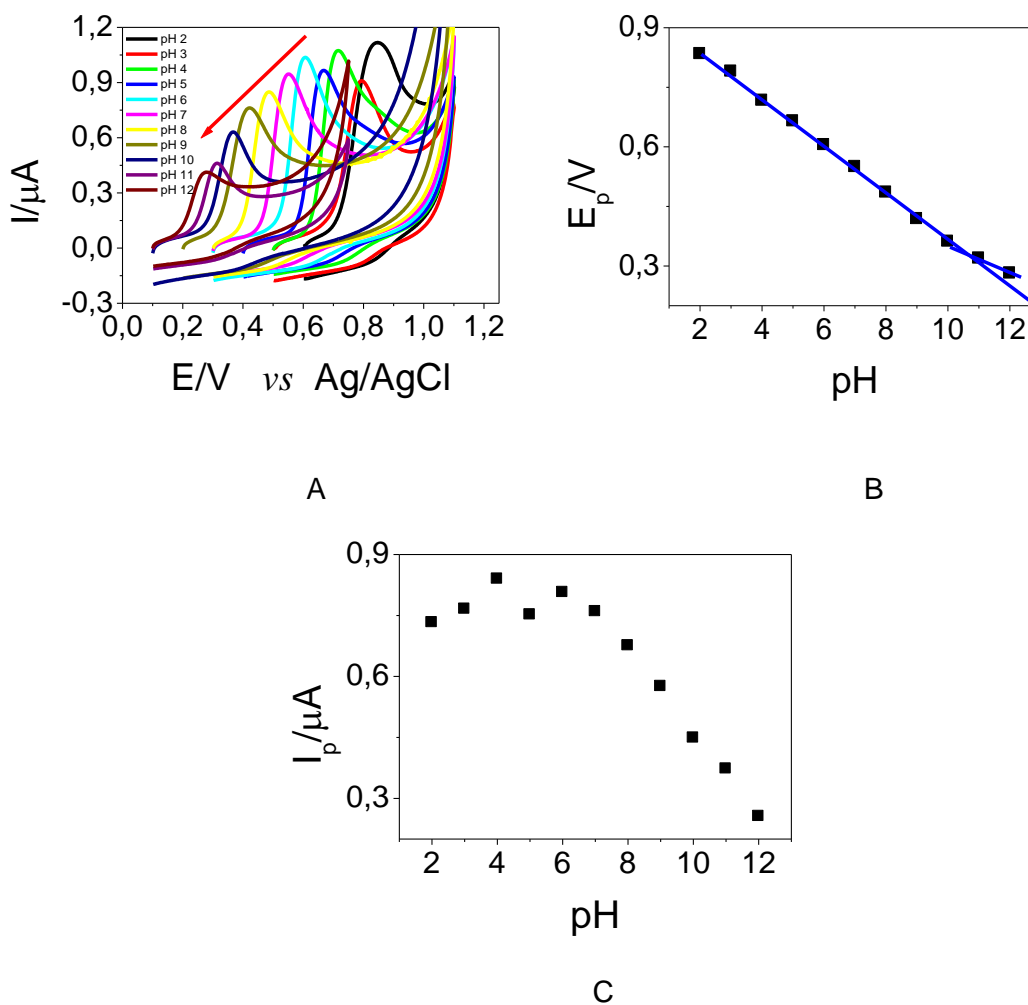
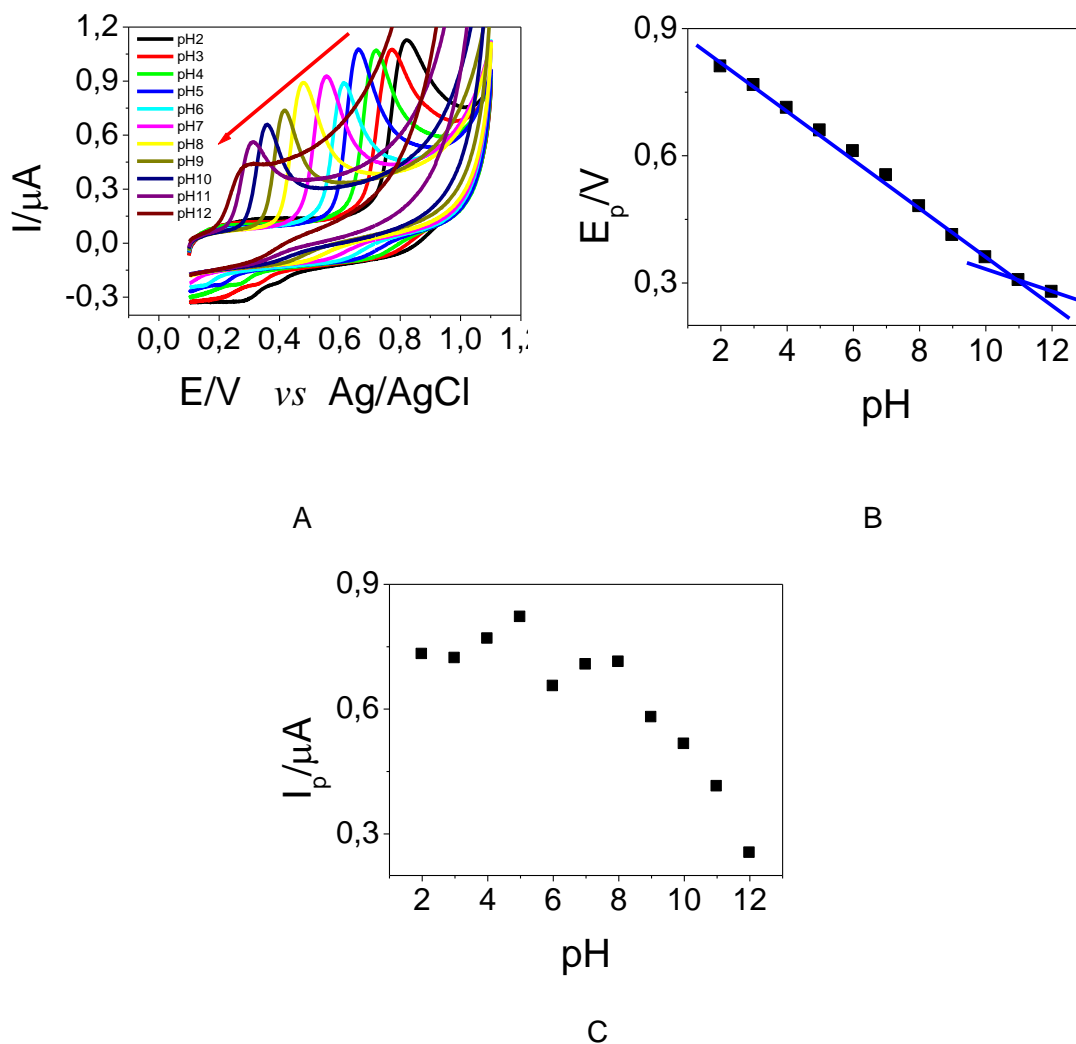


Figura 11: A) Voltamogramas cíclicos da variação do pH do meio para o 17- α -etinilestradiol. B) Potencial de pico da variação do pH do meio para o 17- α -etinilestradiol. C) Intensidade de corrente da variação de pH do meio para o 17- α -etinilestradiol. Tampão BR 0,1 mol L⁻¹; pH 2,0 – 12,0; estrona 5,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹; v = 50 mV s⁻¹.



Os hormônios estriol e 17- α -etinilestradiol apresentaram comportamento semelhante à estrona. Os dois hormônios apresentaram um deslocamento do potencial de pico de oxidação para regiões menos positivas com aumento do pH do meio (Figura 10A e Figura 11A), ambos com duas regiões de linearidade que se interceptam em 10,6 para o estriol e 10,8 para o 17- α -etinilestradiol (Figura 10B e Figura 11B). Estes valores correspondem ao pK_a aparente do grupo hidroxila do anel aromático destes hormônios, os quais na literatura estão em 10,38 e 10,40 para o estriol e o 17- α -etinilestradiol, respectivamente⁽³⁸⁾.

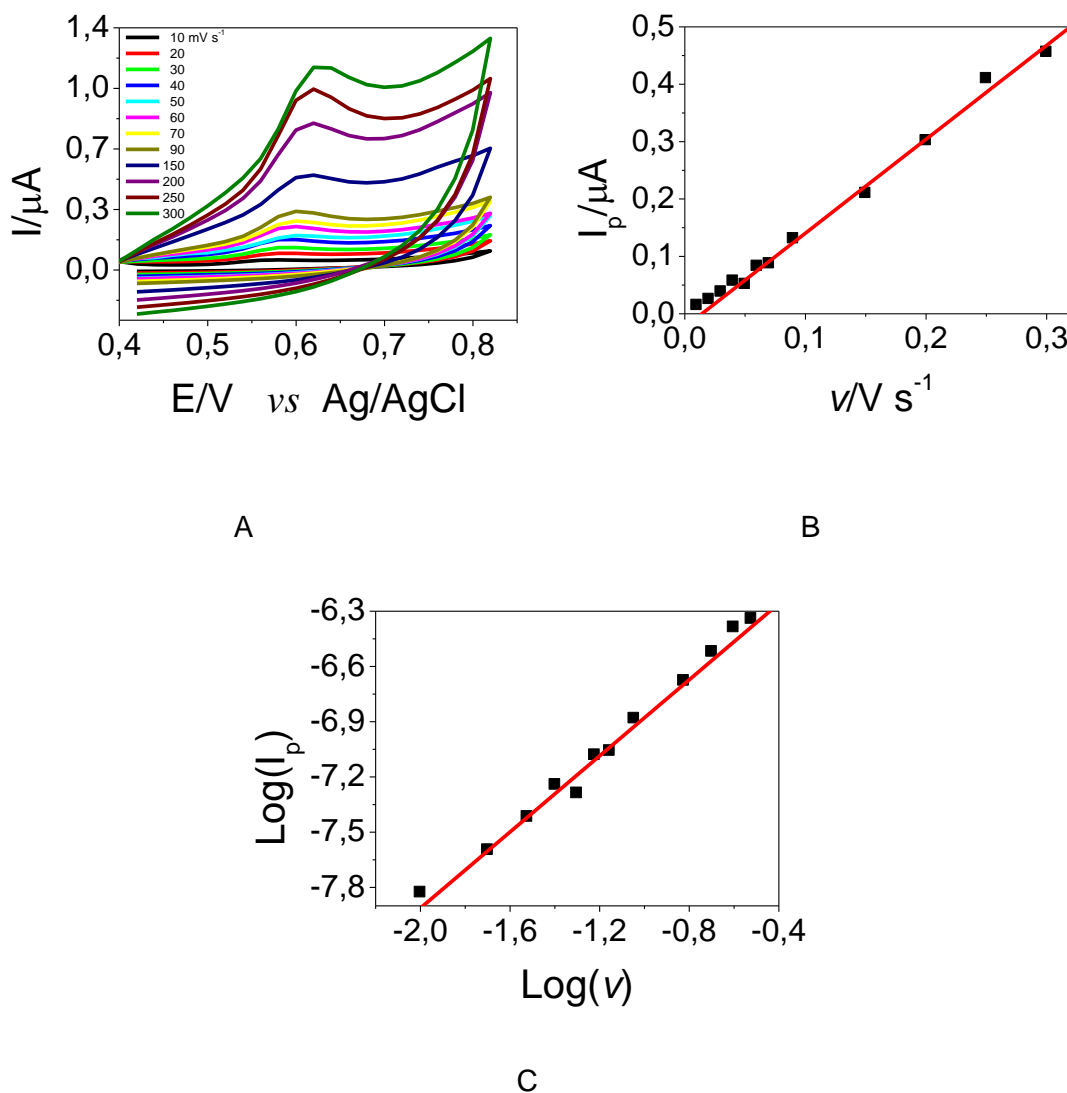
A intensidade de corrente do pico dos voltamogramas também se mostra aparentemente constante entre os pH 2,0 e pH 8,0 diminuindo significativamente em pH maiores (Figura 10C e Figura 11C). Desta forma, optou-se por fazer os demais estudos em pH 7,0, onde se tem voltamogramas bem definidos e com boa intensidade de sinal para os três hormônios em estudo.

4.2 Variação da velocidade de varredura

O estudo da variação da velocidade de varredura pode fornecer informações acerca do processo de oxidação dos hormônios estudados. Este estudo foi realizado no intervalo de velocidade de varredura de 10 a 300 mV s^{-1} .

Nos voltamogramas cíclicos obtidos com a variação da velocidade de varredura para a estrona, observa-se que com o aumento da velocidade de varredura ocorre um deslocamento do potencial de pico de oxidação para regiões de potencial mais positivas (Figura 12A) e a intensidade da corrente de pico apresenta um crescimento linear com a velocidade de varredura (Figura 12B), comportamentos típicos de processos irreversíveis controlados pela adsorção das espécies na superfície do eletrodo⁽⁴⁰⁾.

Figura 12: A) Voltamogramas cíclicos da variação da velocidade de varredura da voltametria cíclica para a estrona. B) Intensidade de corrente da variação a velocidade de varredura para a estrona. C) Gráfico $\log(I_p)$ v.s $\log(v)$ da variação da velocidade de varredura para a estrona. Tampão BR 0,1 mol L⁻¹; pH 7,0; estrona 5,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹; $v = 10 - 300$ mV s⁻¹.



Ainda com os dados da variação da velocidade de varredura da estrona, construiu-se o gráfico do logaritmo da corrente de pico em função do logaritmo da velocidade de varredura (Figura 12C) e obteve-se uma relação linear com coeficiente angular de 1,0, indicando que o processo é controlado pela adsorção das espécies⁽⁴¹⁾.

O estudo da influencia da velocidade de varredura também foi realizado para o estriol (Figura 13) e para o 17- α -etinilestradiol (Figura 14).

Figura 13: A) Voltamogramas cíclicos da variação da velocidade de varredura da voltametria cíclica para o estriol. B) Intensidade de corrente da variação a velocidade de varredura para o estriol. C) Gráfico $\log(I_p)$ v.s $\log(v)$ da variação da velocidade de varredura para o estriol. Tampão BR 0,1 mol L⁻¹; pH 7,0; estrona 5,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹; $v = 10 - 200$ mV s⁻¹.

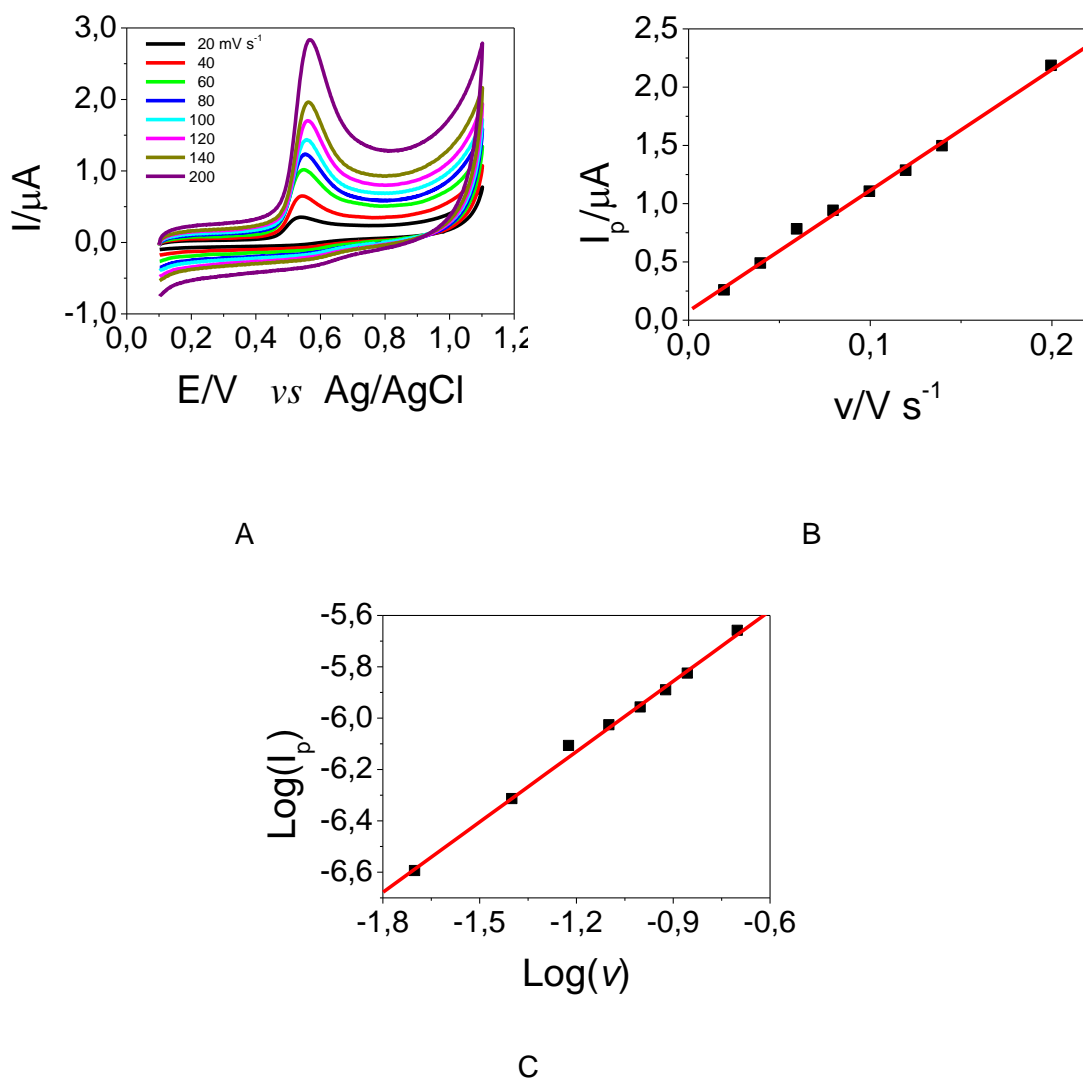
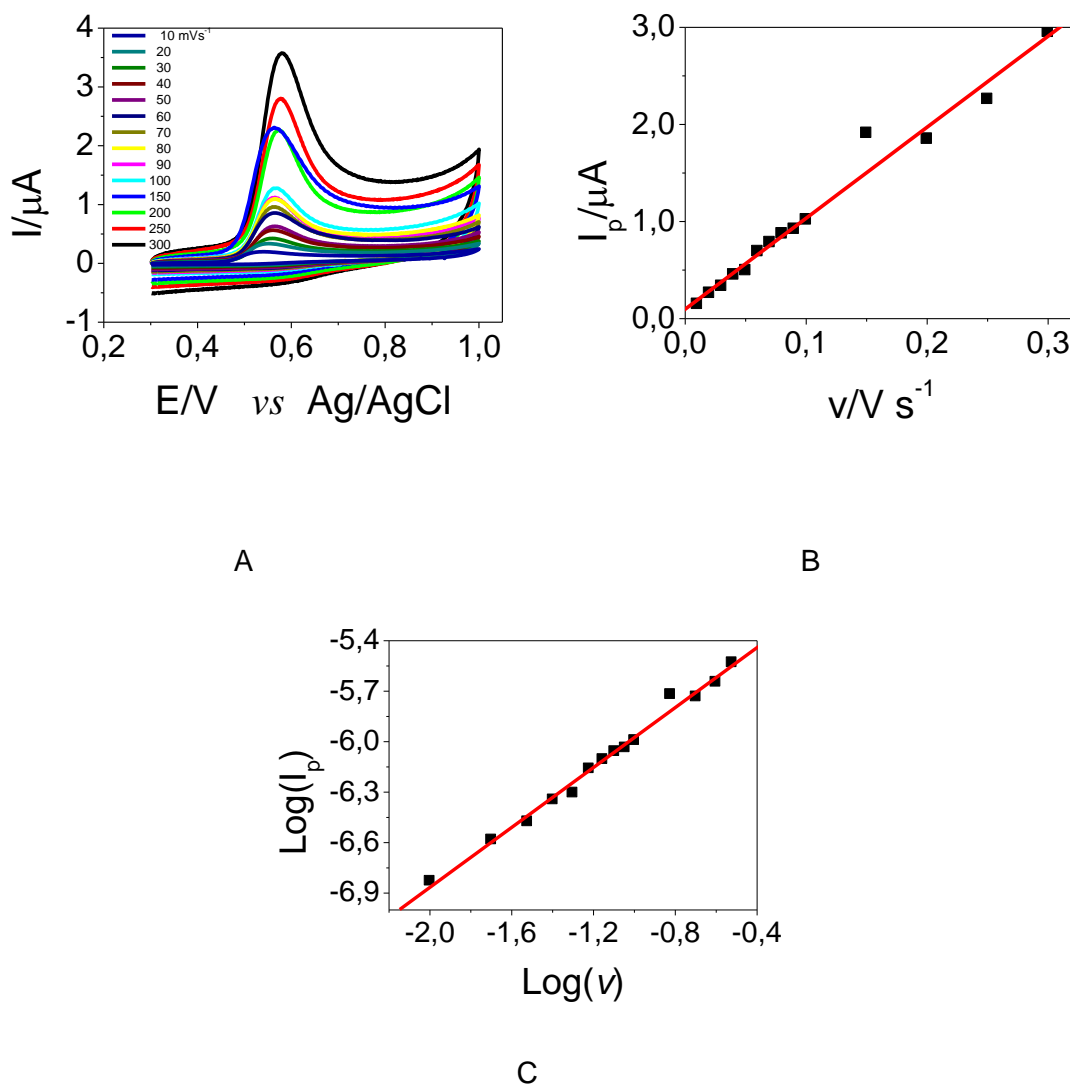


Figura 14: A) Voltamogramas cíclicos da variação da velocidade de varredura da voltametria cíclica para o 17- α -etinilestradiol. B) Intensidade de corrente da variação a velocidade de varredura para o 17- α -etinilestradiol. C) Gráfico $\log(I_p)$ v.s $\log(v)$ da variação da velocidade de varredura para o 17- α -etinilestradiol. Tampão BR 0,1 mol L⁻¹; pH 7,0; estrona 5,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹; $v = 10 - 300$ mV s⁻¹.



Os hormônios estriol e 17- α -etinilestradiol apresentaram comportamento semelhante à estrona, observa-se que com o aumento da velocidade de varredura ocorre um deslocamento do potencial de pico de oxidação para regiões de potencial mais positivas (Figura 13A e Figura 14A).

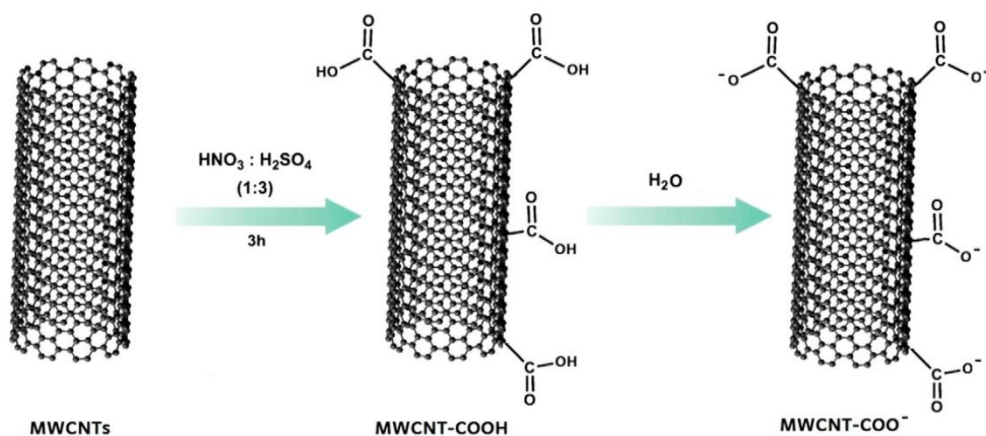
A intensidade das correntes de pico retirada dos voltamogramas apresentou um crescimento linear com a velocidade de varredura (Figura 13B e Figura 14B) e a relação de $\log I_p$ vs. $\log v$ (Figura 13C e Figura 14C), apresentou coeficiente angular igual a 0,91 e 0,89, para o estriol e

17- α -etinilestradiol, respectivamente, valores próximos de 1,0. Características típicas de processos irreversíveis controlados por adsorção das espécies⁽⁴¹⁾.

4.3 Modificação do eletrodo

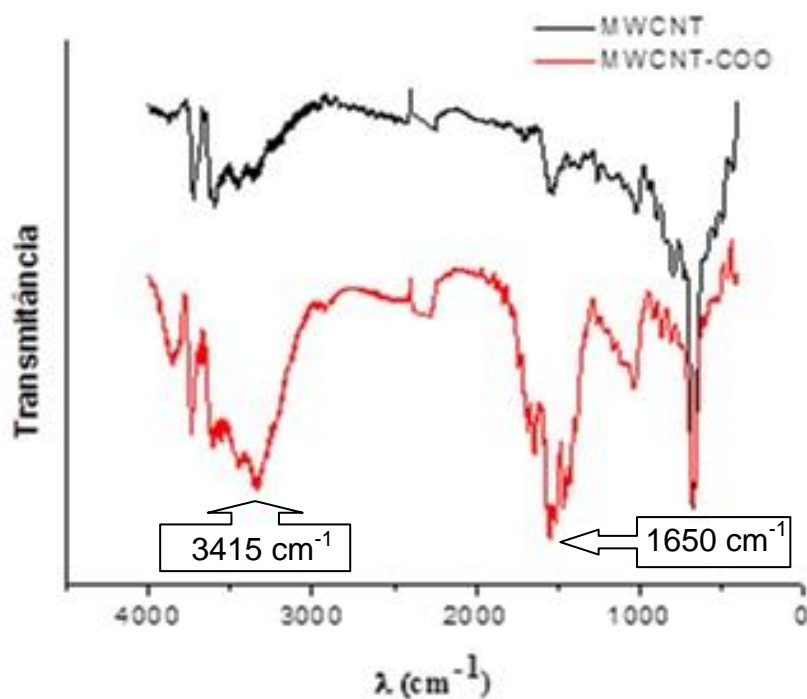
A funcionalização dos nanotubos de carbono (MWCNT) por meio do tratamento ácido tem como o objetivo a formação de grupos funcionais carboxílicos na superfície dos nanotubos (MWCNT/COOH), por meio do processo de lavagens sucessivas dos nanotubos, seguidas de centrifugação, retirou-se os resíduos ácidos utilizados para a funcionalização, conferindo o pH da solução de lavagem até que a mesma se apresentasse neutra, aumentando assim a carga negativa dos nanotubos⁽⁴²⁾ (MWCNT/COO⁻) (Figura 15).

Figura 15: Funcionalização dos nanotubos de carbono (MWCNT – MWCNT/COO⁻).



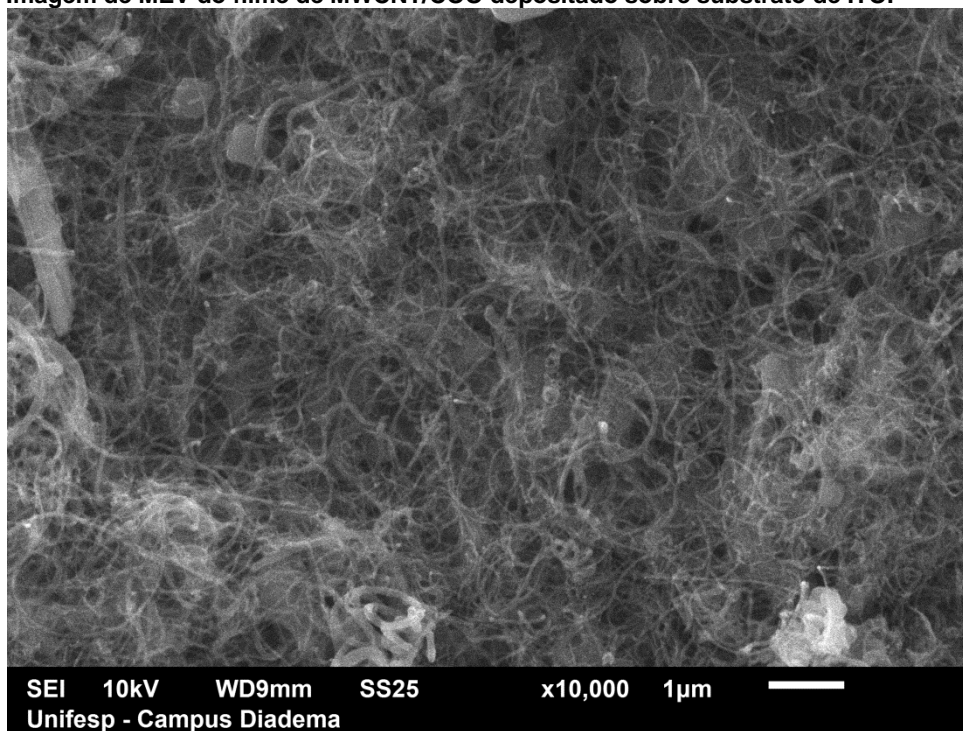
No espectro FTIR da amostra de nanotubos de carbono (Figura 16) é possível observar o surgimento dos picos de comprimento de onda 3415 cm^{-1} e 1650 cm^{-1} , estes picos podem ser atribuídos às vibrações de estiramento das ligações OH e C=O, respectivamente⁽⁴³⁾. A presença destes picos sugere que a funcionalização produziu grupos carboxílicos na superfície dos MWCNT como era esperado⁽²⁶⁾.

Figura 16: Imagem de FTIR das amostras de MWCNT e MECNT/COO em pastilhas de KBr.



Utilizando-se a técnica de microscopia de varredura eletrônica caracterizou-se o filme de MWCNT/COO depositado sobre um substrato de vidro recoberto com óxido de índio (ITO) (Figura 17).

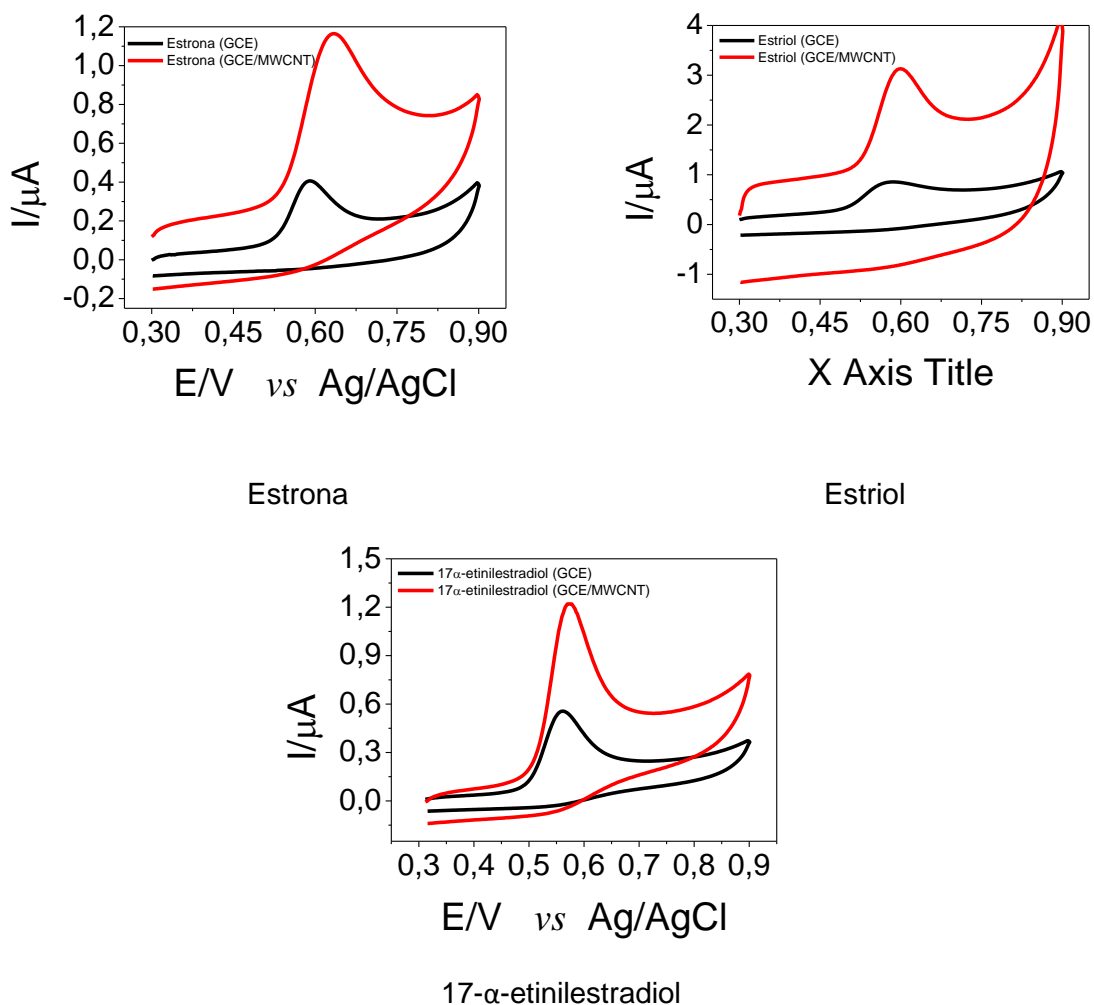
Figura 17: Imagem de MEV do filme de MWCNT/COO depositado sobre substrato de ITO.



A imagem de MEV do filme de MWCNT/COO mostra que os nanotubos de carbono recobrem todo o substrato, não havendo a formação de aglomerados ou vacâncias em sua cobertura. Assim, observa-se que diferentemente da prática comum em outros estudos, nos quais utiliza-se uma dispersão concentrada de nanotubos que é aplicada uma única vez, o uso da dispersão mais diluída com aplicações sucessivas recobre a superfície de forma mais homogênea, resultados semelhantes aos obtidos por Palazzo et al⁽³⁴⁾.

O eletrodo modificado foi testado para o estudo dos três hormônios utilizando-se a voltametria cíclica (Figura 18).

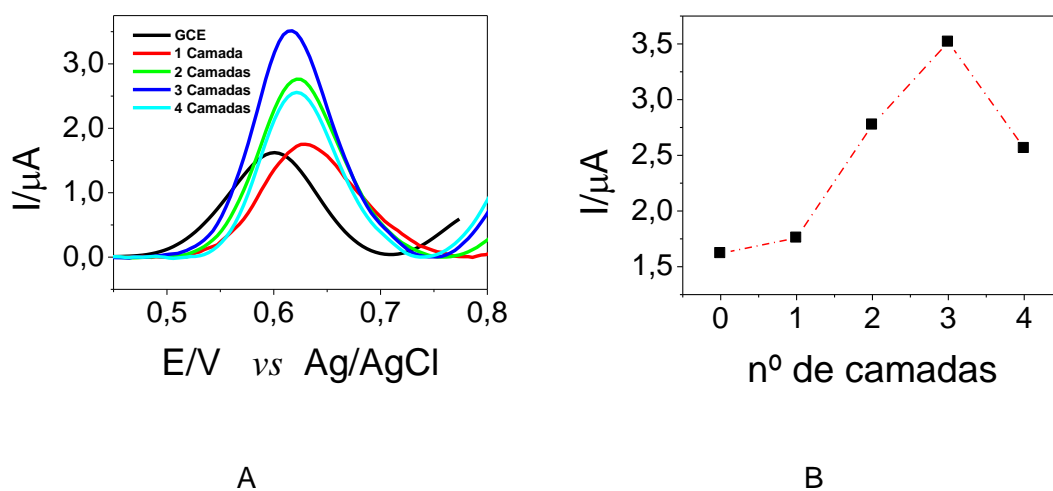
Figura 18: Voltamogramas cíclicos dos hormônios sobre os eletrodos modificado e sem modificar. Tampão BR; pH 7,0; concentração $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



Observa-se que para os três hormônios a modificação propiciou um aumento significativo na intensidade do sinal, o aumento foi da ordem de 2,5 vezes para a estrona, 3,0 vezes para o estriol e 2,0 vezes para o 17- α -etinilestradiol.

O sinal de oxidação da estrona ($5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) foi avaliado sobre o GCE modificado com os MWCNT variando o número de camadas de dispersão entre uma e quatro adições (Figura 19), visando verificar a quantidade ótima de adições da dispersão de nanotubos de carbono que promovem o aumento do sinal eletroquímico do hormônio.

Figura 19: Avaliação do efeito do número de adições da solução de MWCNTs (A – Voltamogramas; B – Intensidade). Tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, estrona $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Amplitude – 50 mV, Frequência 250 mV, Incremento de varredura – 4 mV.



Observa-se na Figura 19A que a modificação promove um deslocamento do potencial de pico da estrona para regiões mais positivas e aumenta a intensidade da corrente de pico. Na Figura 19B pode-se observar o aumento da intensidade da corrente com o número de camadas de MWCNT adicionadas, nota-se um aumento entre a 1ª e a 3ª adição (aproximadamente 2,5 vezes), diminuindo a partir a 4ª adição. Assim verificou-se que o número ótimo de camadas de MWCNT ficou em 3 adições.

4.4 Otimização dos parâmetros da voltametria da onda quadrada

Os parâmetros que envolvem a voltametria de onda quadrada, amplitude da onda quadrada, frequência da onda quadrada e incremento de varredura, foram otimizados sobre o eletrodo sem modificação e sobre o eletrodo modificado, sendo a concentração de hormônio na célula eletroquímica de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ no estudo com eletrodo sem modificação e de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ no estudo com o eletrodo modificado.

A sensibilidade da voltametria de onda quadrada pode ser melhorada com o aumento da amplitude de aplicação do pulso, em processos irreversíveis a largura de meia onda se mantém constante para valores de amplitude maiores que 20 mV⁽⁴⁴⁾.

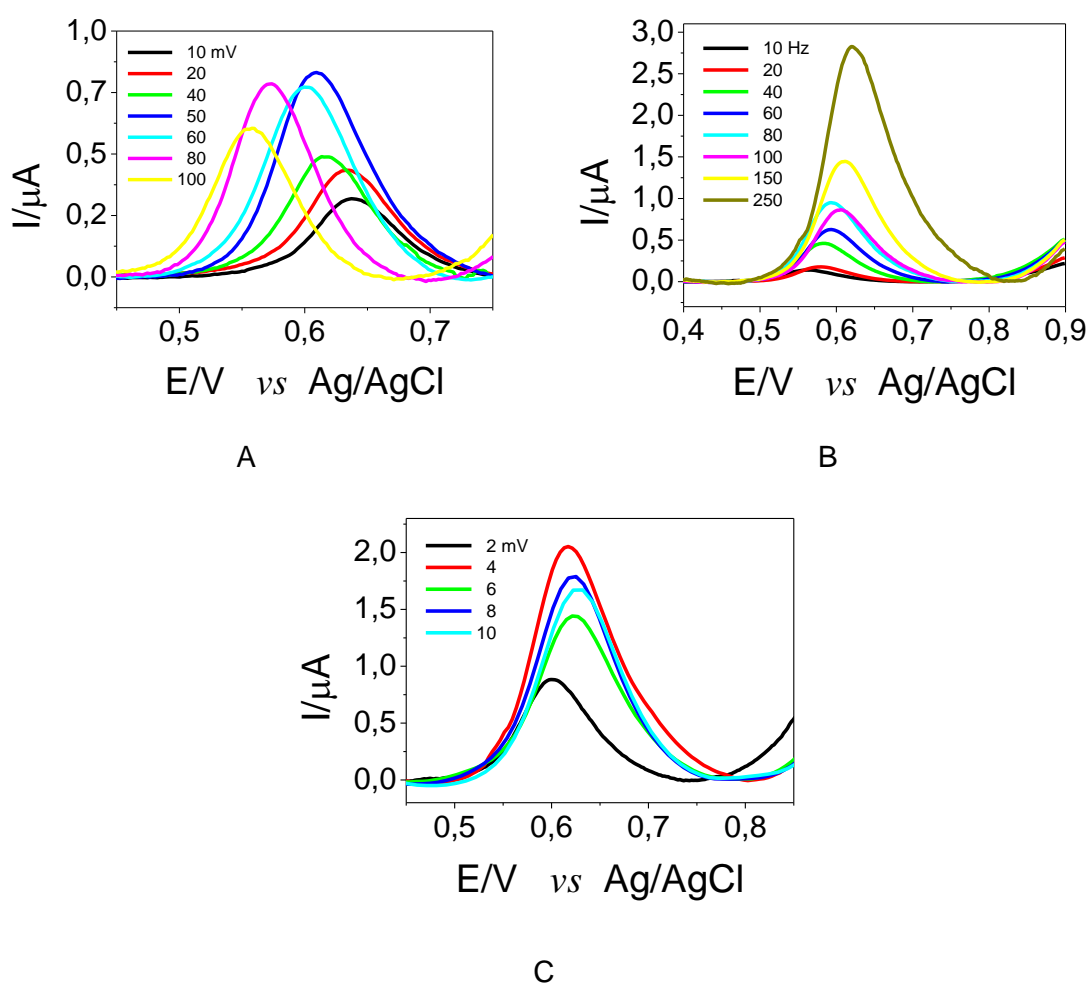
O estudo da variação da frequência da onda quadrada contribui para a obtenção de informações a respeito do comportamento eletroquímico do composto, o aumento da frequência da onda quadrada proporciona um aumento significativo na intensidade da corrente de pico⁽⁴¹⁾. Para sistemas irreversíveis a corrente de pico apresenta uma relação linear com a frequência⁽⁴⁴⁾

Já o produto do parâmetro incremento de varredura da onda quadrada com a frequência da onda quadrada determinam a velocidade efetiva da voltametria de onda quadrada, assim, incrementos maiores podem aumentar significativamente a sensibilidade do método, entretanto incrementos muito altos podem promover o alargamento dos picos obtidos comprometendo a resolução dos voltamogramas.

4.4.1 Eletrodo sem modificação (GCE)

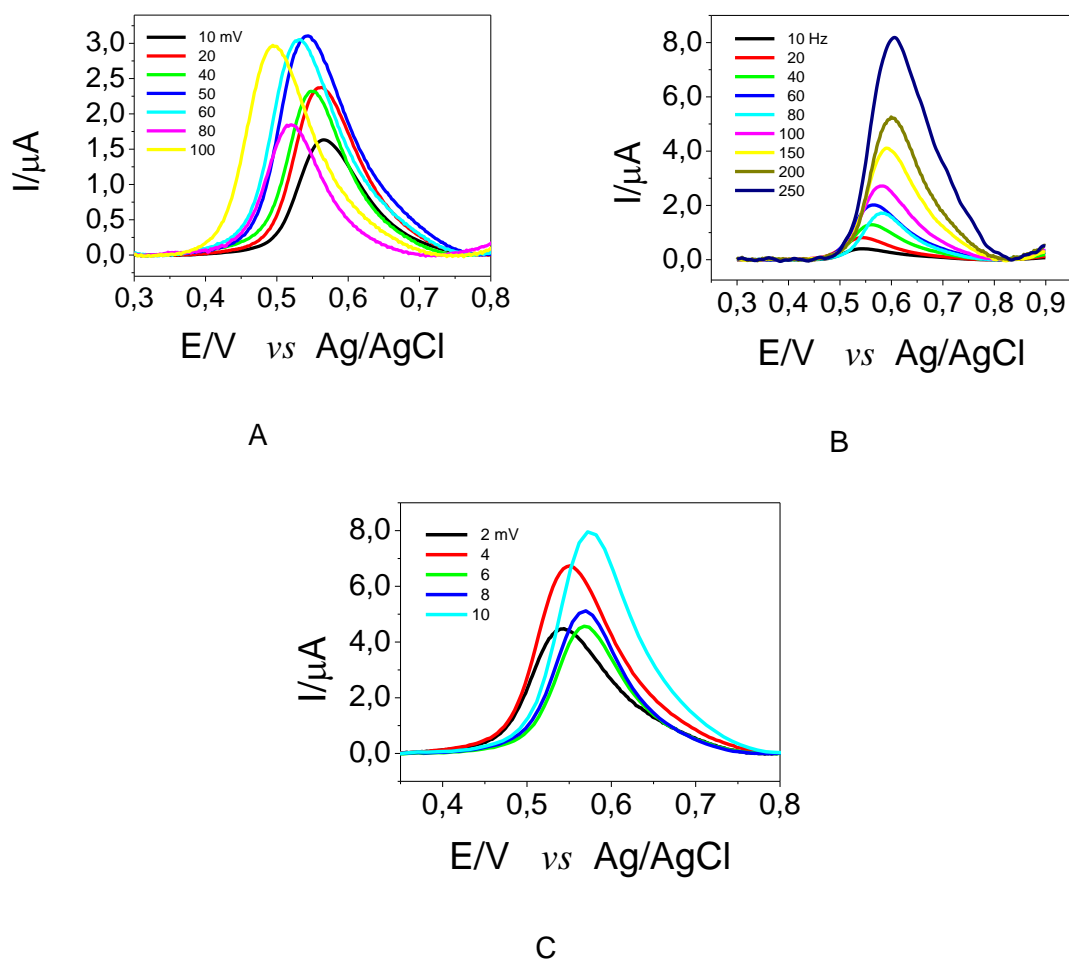
Os parâmetros da voltametria da onda quadrada foram otimizados utilizando-se o eletrodo de carbono vítreo sem modificação. Este estudo foi efetuado com a concentração de cada hormônio em $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Os voltamogramas de onda quadrada obtidos para a estrona são apresentados na (Figura 20), para o estriol na (Figura 21) e para o 17- α -etinilestradiol na (Figura 22).

Figura 20: Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a estrona. Tampão BR pH 7,0; Concentração = $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.



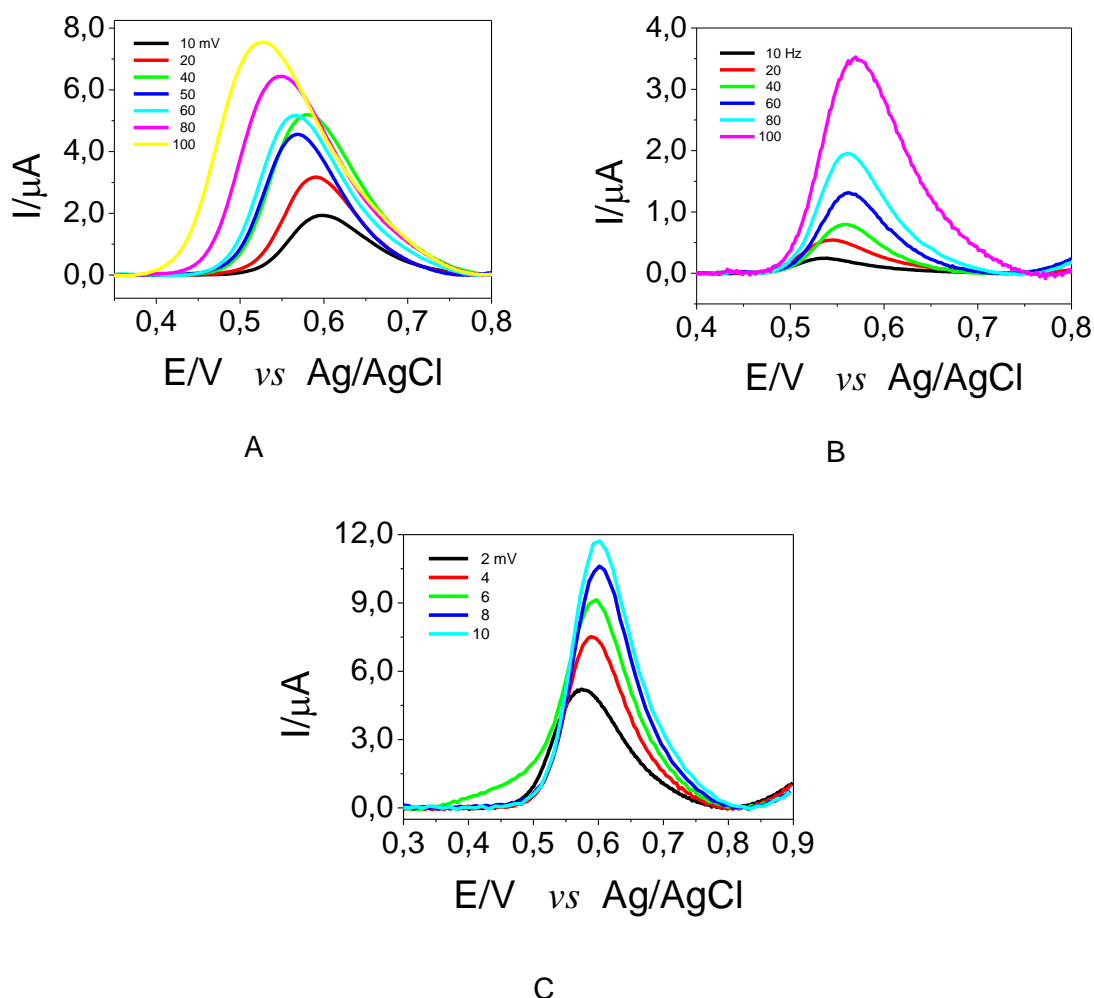
(A) amplitude = 10 - 100 mV, frequência = 100 Hz, incremento de varredura = 2 mV.
(B) Frequência = 10 - 250 Hz, amplitude = 50 mV, incremento de varredura = 2 mV.
(C) Incremento de varredura = 2 - 10 mV, amplitude = 50 mV, frequência = 100 Hz.

Figura 21: Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o estriol. Tampão BR pH 7,0; Concentração = $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.



(A) amplitude = 10 - 100 mV, frequência = 100 Hz, incremento de varredura = 2 mV.
 (B) Frequência = 10 - 250 Hz, amplitude = 50 mV, incremento de varredura = 2 mV.
 (C) Incremento de varredura = 2 - 10 mV, amplitude = 50 mV, frequência = 100 Hz.

Figura 22: Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o estriol. Tampão BR pH 7,0; Concentração = $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.



(A) amplitude = 10 - 100 mV, frequência = 100 Hz, incremento de varredura = 2 mV.
 (B) Frequência = 10 - 100 Hz, amplitude = 50 mV, incremento de varredura = 2 mV.
 (C) Incremento de varredura = 2 - 10 mV, amplitude = 50 mV, frequência = 100 Hz.

Observa-se que para a variação do parâmetro frequência da onda quadrada o potencial do pico de oxidação desloca-se para potenciais mais positivos para os três hormônios (Figura 20B, Figura 21B e Figura 22B), estrona, estriol e 17- α -etinilestradiol, respectivamente. Tal comportamento é característico de processos irreversíveis controlados pela adsorção das espécies na superfície do eletrodo^(49,50,51), isto corrobora com os resultados obtidos pela variação da velocidade de varredura na voltametria cíclica.

Os hormônios estrona e estriol se comportaram de modo muito semelhante, observa-se que com a variação da amplitude da onda quadrada, a intensidade da corrente de pico para estes dois hormônios apresenta um

crescimento linear até 50 mV, decaindo em intensidade a partir deste valor (Figura 23A ,Figura 24A).

Figura 23: Intensidade de corrente de pico em função da variação dos parâmetros da onda quadrada para a estrona (dados retirados da Figura 20).

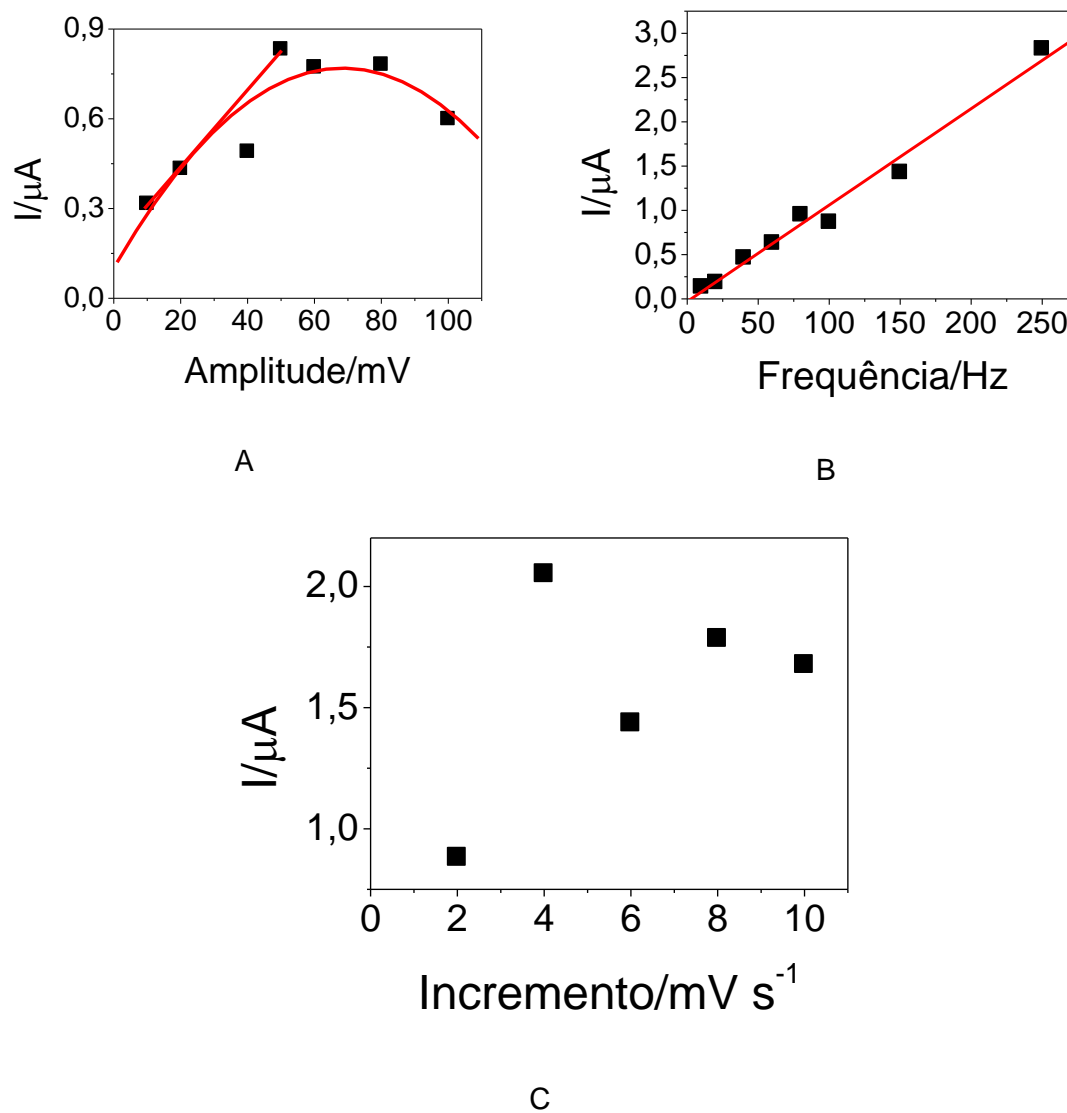
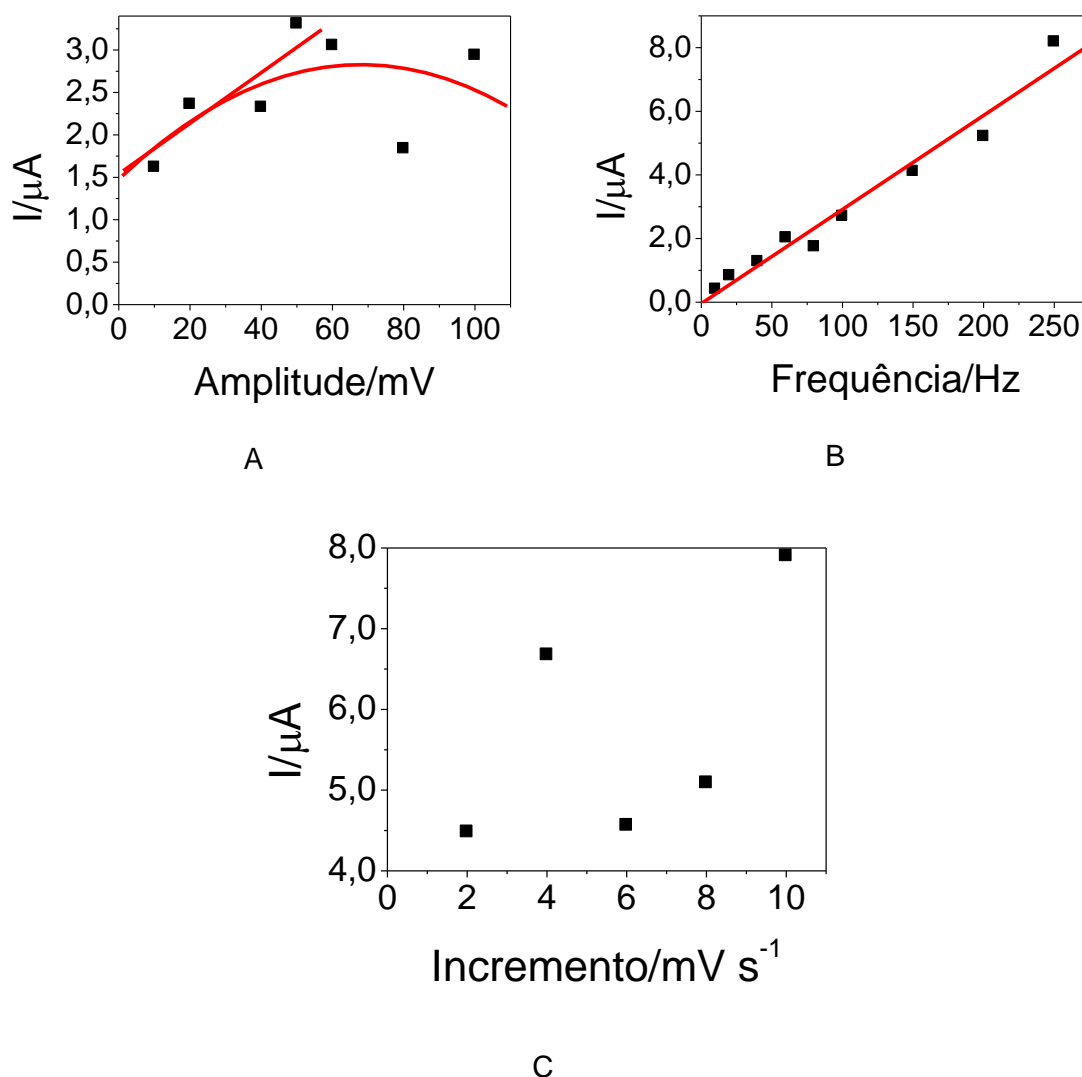


Figura 24: Intensidade de corrente de pico em função da variação dos parâmetros da onda quadrada para o estriol (dados retirados da Figura 21).



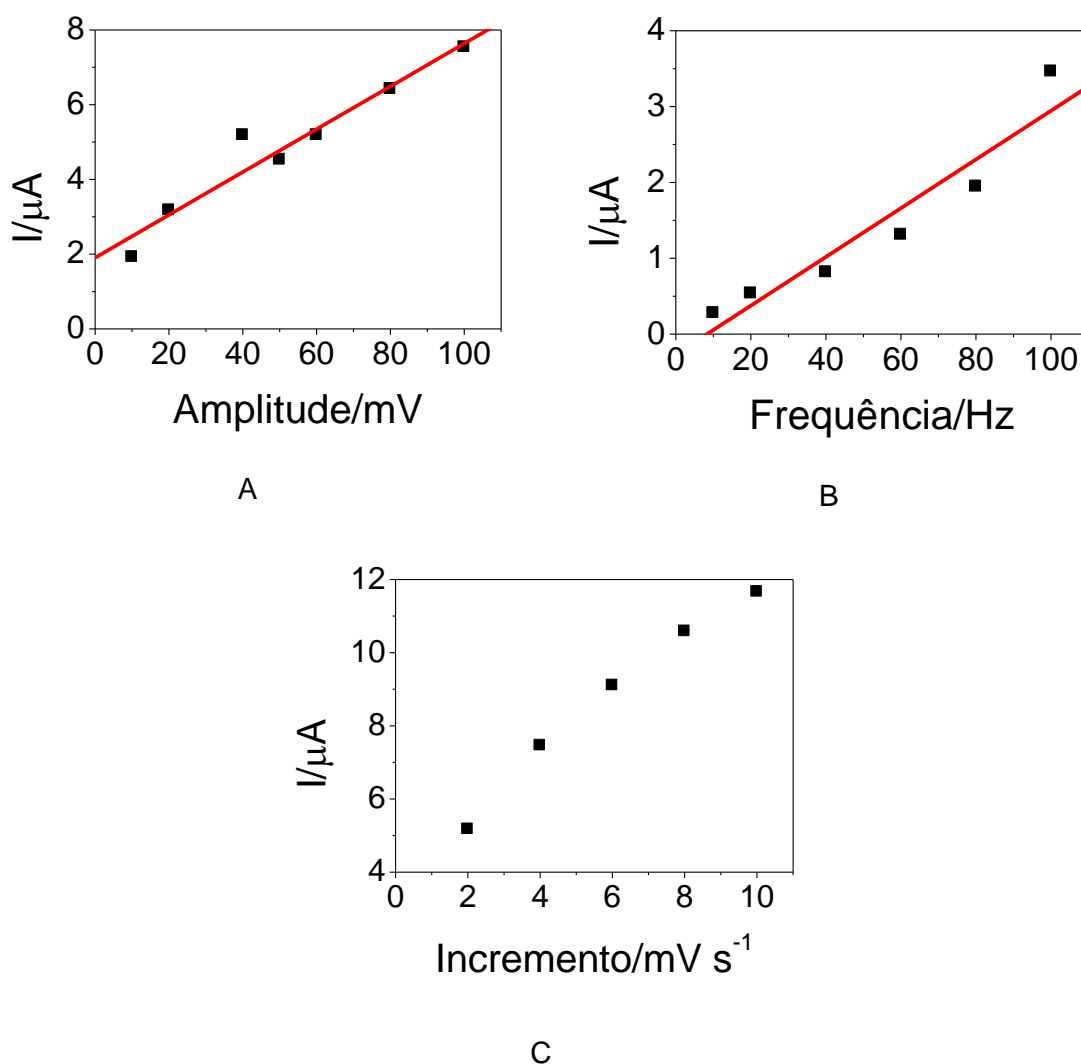
Para a variação da frequência da onda quadrada a intensidade da corrente de pico apresenta um comportamento crescente e linear com a frequência (Figura 23B e Figura 24), característica de processos irreversíveis controlados pela adsorção da espécie na superfície do eletrodo^(49,50,51), corroborando com os resultados obtidos pela variação da velocidade de varredura na voltametria cíclica.

A variação do incremento de varredura para a estrona, mostrou que uma maior intensidade de corrente de pico ocorre em incremento de 4 mV, já o estriol apresentou uma maior intensidade de corrente de pico com incremento de 10 mV, porém não muito superior ao valor obtido em 4 mV.

Assim, para os dois hormônios, os parâmetros da voltametria de onda quadrada otimizados foram de 50 mV, 250 Hz e 4 mV, para amplitude da onda quadrada, frequência da onda quadrada e incremento de varredura, respectivamente. Estes valores foram selecionados por apresentarem maior intensidade de sinal e boa definição dos voltamogramas.

O hormônio 17- α -etinilestradiol apresentou um comportamento semelhante à estrona e ao estriol para a variação de frequência da onda quadrada, a intensidade da corrente de pico apresenta um crescimento linear com a frequência (Figura 25B), indicando que o processo é irreversível e controlado pela adsorção da espécie na superfície do eletrodo, mais uma vez corroborando com os resultados obtidos pela variação da velocidade de varredura na voltametria cíclica.

Figura 25: Intensidade de corrente de pico em função da variação dos parâmetros da onda quadrada para o 17- α -etinilestradiol (dados retirados da Figura 22).



A variação da amplitude da onda quadrada indicou que intensidade da corrente de pico varia linearmente com amplitude até o valor de 100 mV (Figura 25A). Para o incremento de varredura observou-se que melhores resultados em termos de intensidade de corrente são obtidos em incremento de varredura de 8 mV (Figura 25C). Assim, os parâmetros da voltametria de onda quadrada otimizados para o 17- α -etinilestradiol foram 100 mV, 100 Hz e 8 mV, para amplitude da onda quadrada, frequência da onda quadrada e incremento de varredura, respectivamente. Tais valores foram selecionados por apresentarem maior intensidade de sinal no caso da amplitude e da frequência e pela boa definição do voltamograma.

Na Tabela 2 estão listados os parâmetros da onda quadrada selecionados para o estudo de cada hormônio sobre o eletrodo de carbono vítreo sem modificação.

Tabela 2: Parâmetros da voltametria da onda quadrada para os hormônios em estudo sobre o eletrodo de carbono vítreo sem modificação.

Hormônio	Amplitude	Frequência	Incremento
Estrona	50 mV	250 Hz	4 mV
Estriol	50 mV	250 Hz	4 mV
17- α -etinilestradiol	100 mV	100 Hz	8 mV

4.4.2 Eletrodo modificado (GCE/MWCNT)

Após a modificação do eletrodo de carbono vítreo com os nanotubos de carbono, os parâmetros que envolvem a voltametria da onda quadrada foram otimizados para cada hormônio de forma separada utilizando-se o eletrodo de carbono vítreo com modificação (GCE/MWCNT).

Nas Figura 26A, Figura 27A e Figura 28A estão apresentados os voltamogramas obtidos para os hormônios estrona, estriol e 17- α -etinilestradiol, respectivamente, em função da variação da amplitude da onda quadrada sobre o eletrodo de carbono vítreo modificado.

Figura 26: A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a estrona em função da variação da amplitude. B) Variação da corrente de pico em função da amplitude da onda quadrada. Tampão BR 0,1 mol L⁻¹; pH 7,0; estrona 5,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹; Amplitude = 10 – 100 mV, Frequência = 100 Hz, Incremento de varredura = 2 mV.

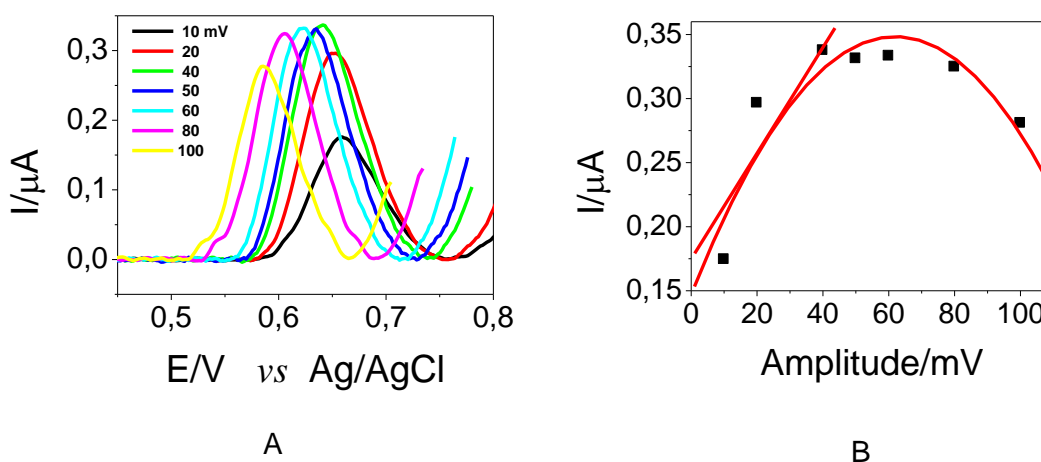


Figura 27: A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o estriol em função da variação da amplitude. B) Variação da corrente de pico em função da amplitude da onda quadrada. Tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0; estriol $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; Amplitude = 10 – 100 mV, Frequência = 100 Hz, Incremento de varredura = 2 mV.

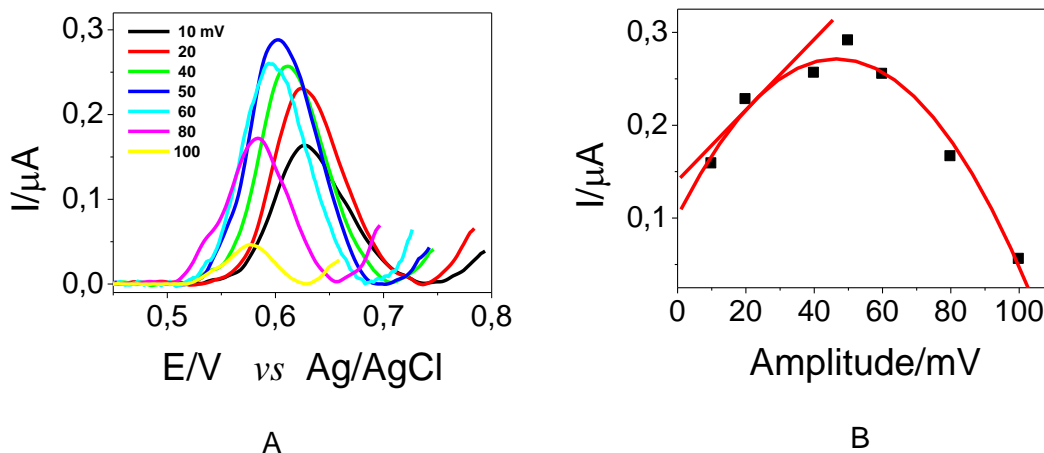
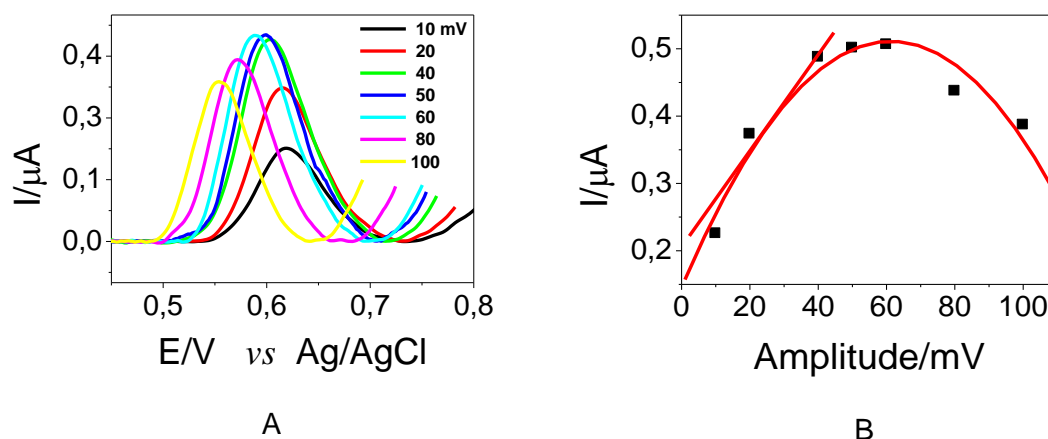


Figura 28: A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o 17- α -etinilestradiol em função da variação da amplitude. B) Variação da corrente de pico em função da amplitude da onda quadrada. Tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0; 17- α -etinilestradiol $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; Amplitude = 10 – 100 mV, Frequência = 100 Hz, Incremento de varredura = 2 mV.



Observa-se que para a variação da amplitude da onda quadrada a intensidade de corrente de pico aumenta até amplitudes entre 40 e 50 mV para os três hormônios (Figura 26B, Figura 27B e Figura 28B), apresentando deslocamento do pico para potências menos positivos e diminuição da intensidade de corrente para valores de amplitude superiores a 60 mV, assim optou-se pelo valor de amplitude da onda quadrada de 50 mV para os três hormônios.

Nas Figura 29A, Figura 30A e Figura 31A estão apresentados os voltamogramas obtidos com a variação da frequência da onda quadrada para os hormônios estrona, estriol e 17- α -etinilestradiol, respectivamente.

Figura 29: A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a estrona em função da variação da frequência da onda quadrada. B) Variação da intensidade da corrente de pico em função da frequência da onda quadrada. Tampão BR 0,1 mol L⁻¹; pH 7,0; estrona 5,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹; Amplitude = 50 mV, Frequência = 25 – 250 Hz, Incremento de varredura = 2 mV.

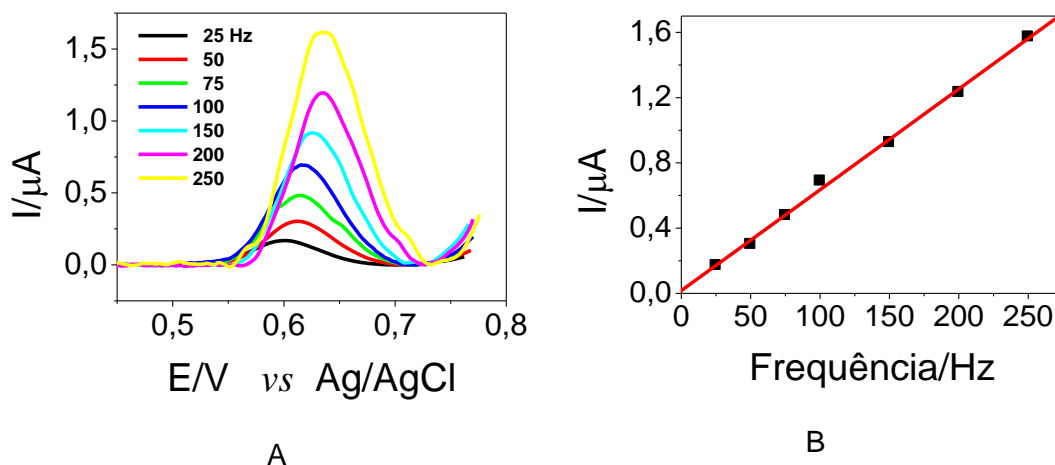


Figura 30: A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o estriol em função da variação da frequência da onda quadrada. B) Variação da intensidade da corrente de pico em função da frequência da onda quadrada. Tampão BR 0,1 mol L⁻¹; pH 7,0; estriol 5,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹; Amplitude = 50 mV, Frequência = 25 – 250 Hz, Incremento de varredura = 2 mV.

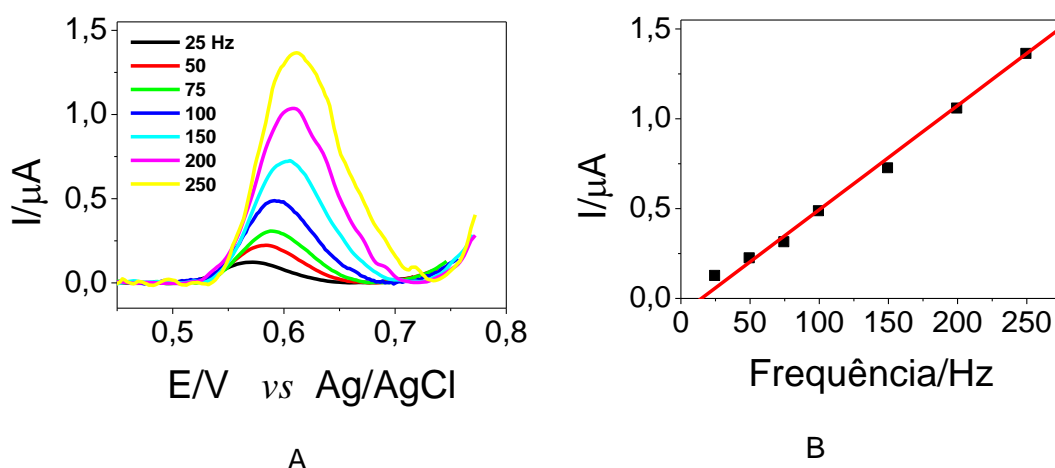
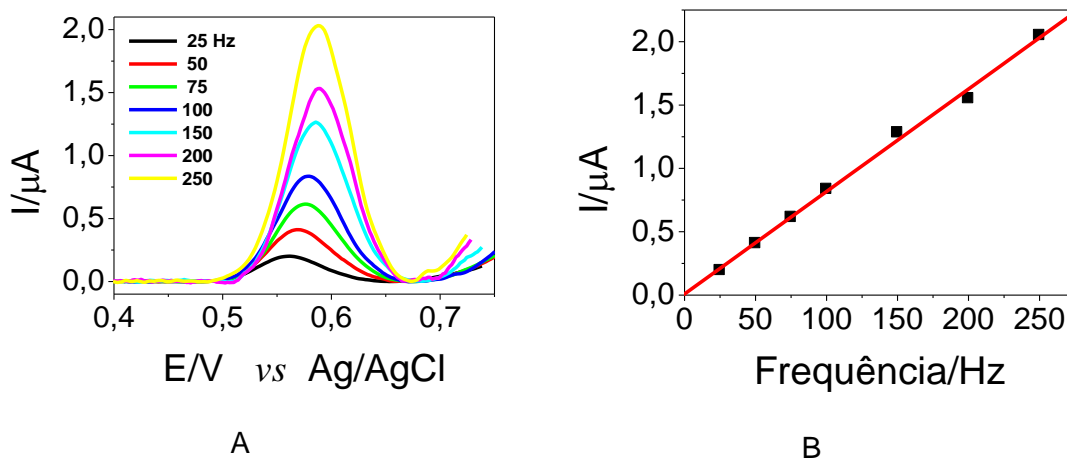


Figura 31: A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o 17- α -etinilestradiol em função da variação da frequência da onda quadrada. B) Variação da intensidade da corrente de pico em função da frequência da onda quadrada. Tampão BR 0,1 mol L⁻¹; pH 7,0; 17- α -etinilestradiol 5,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹; Amplitude = 50 mV, Frequência = 25 – 250 Hz, Incremento de varredura = 2 mV.



Os voltamogramas do estudo da variação da frequência da onda quadrada apresentaram deslocamento para potenciais mais positivos com o aumento da frequência (Figura 29A, Figura 30A, e Figura 31A), observa-se também um crescimento linear da intensidade de corrente com o aumento da frequência (Figura 29B, Figura 30B, e Figura 31B), características de processos irreversíveis controlados pela adsorção da espécie na superfície do eletrodo^(29,30), corroborando com os resultados obtidos pela variação de velocidade de varredura na voltametria cíclica. Este comportamento foi observado para os três hormônios em estudo. Assim, optou-se por escolher a frequência de 250 Hz para os próximos estudos com os três hormônios.

Nas Figura 32A, Figura 33A e Figura 34A estão apresentados os voltamogramas obtidos com a variação da frequência da onda quadrada para os hormônios estrona, estriol e 17- α -etinilestradiol, respectivamente.

Figura 32: A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a estrona em função da variação do incremento de varredura da onda quadrada. B) Variação da intensidade da corrente de pico em função do incremento de varredura da onda quadrada. Tampão BR 0,1 mol L⁻¹; pH 7,0; estrona 5,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹; Amplitude = 50 mV, Frequência = 100 Hz, Incremento de varredura = 2 – 10 mV.

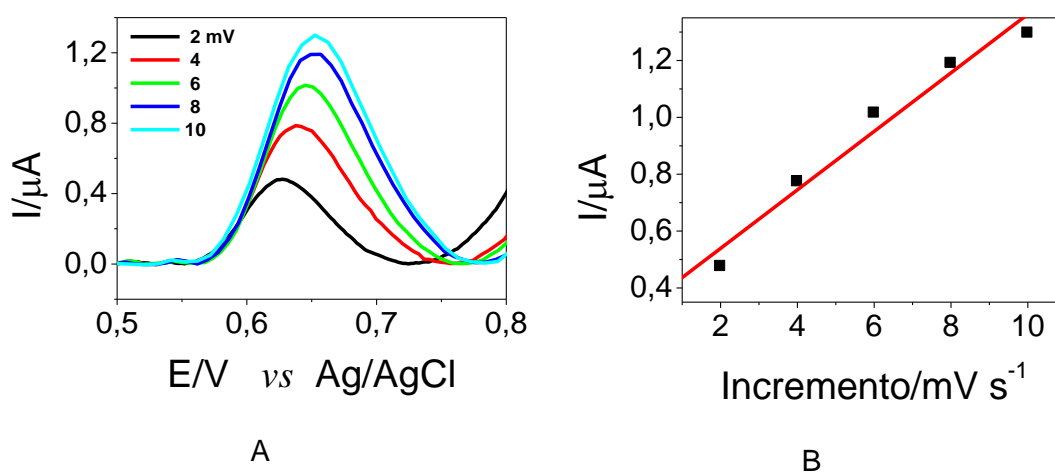


Figura 33: A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o estriol em função da variação do incremento de varredura da onda quadrada. B) Variação da intensidade da corrente de pico em função do incremento de varredura da onda quadrada. Tampão BR 0,1 mol L⁻¹; pH 7,0; estriol 5,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹; Amplitude = 50 mV, Frequência = 100 Hz, Incremento de varredura = 2 – 10 mV

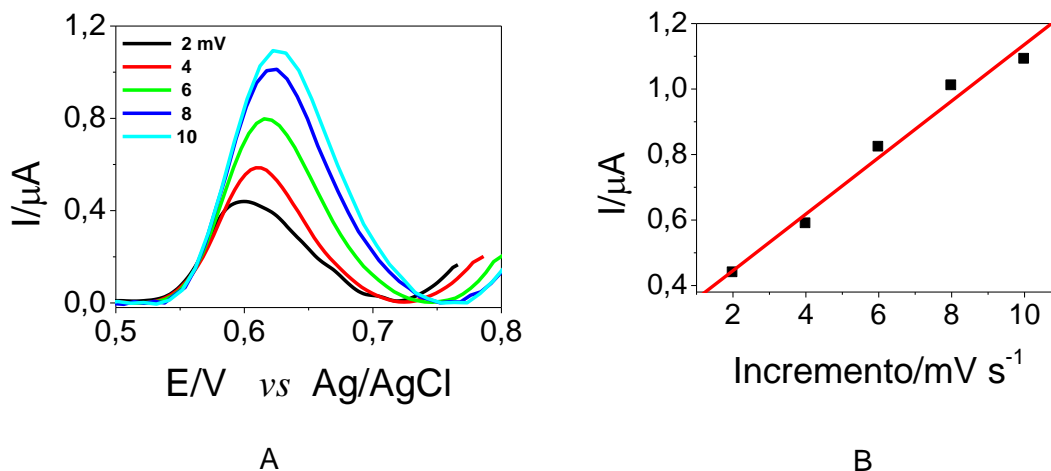
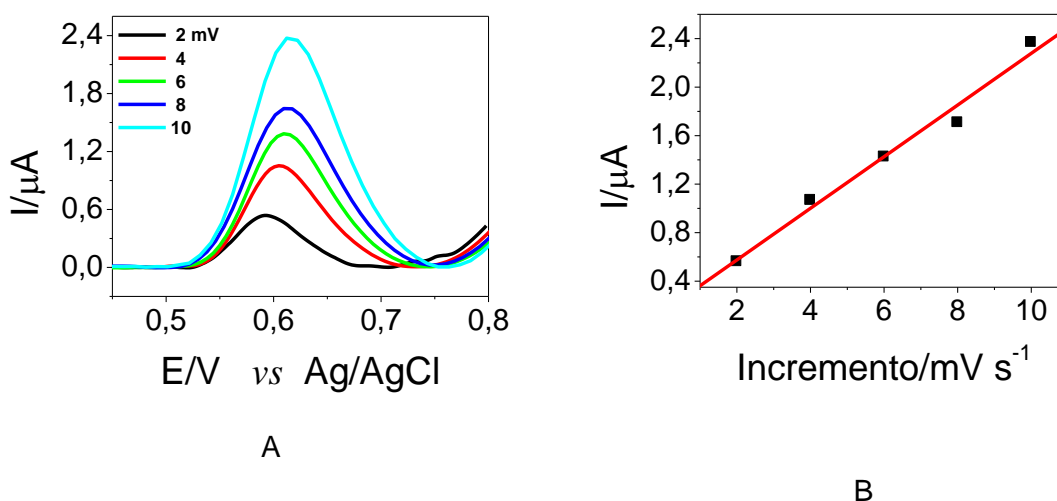


Figura 34: A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o 17- α -etinilestradiol em função da variação do incremento de varredura da onda quadrada. B) Variação da intensidade da corrente de pico em função do incremento de varredura da onda quadrada. Tampão BR 0,1 mol L⁻¹; pH 7,0; 17- α -etinilestradiol 5,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹; Amplitude = 50 mV, Frequência = 100 Hz, Incremento de varredura = 2 – 10 mV



Os voltamogramas do estudo da variação do incremento de varredura da onda quadrada apresentaram deslocamento para potenciais mais positivos e alargamento dos picos com o aumento do incremento de varredura (Figura 32, Figura 33 e Figura 34), observa-se também um crescimento linear da intensidade de corrente de pico e o alargamento do sinal. Desta forma, os demais estudos foram realizados com incremento de 2 mV.

Os parâmetros da voltametria de onda quadrada selecionado para os três hormônios em estudo sobre o eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono estão apresentados na Tabela 3, valores estes semelhantes aos encontrados por Brocenschi *et al*⁽⁴⁷⁾.

Tabela 3: Parâmetros da voltametria da onda quadrada otimizados para a determinação dos hormônios estrona, estriol e 17- α -etinilestradiol sobre o GCE/MWCNT.

Hormônio	Amplitude	Frequência	Incremento
Estrona	50 mV	250 Hz	2 mV
Estriol	50 mV	250 Hz	2 mV
17- α -etinilestradiol	50 mV	250 Hz	2 mV

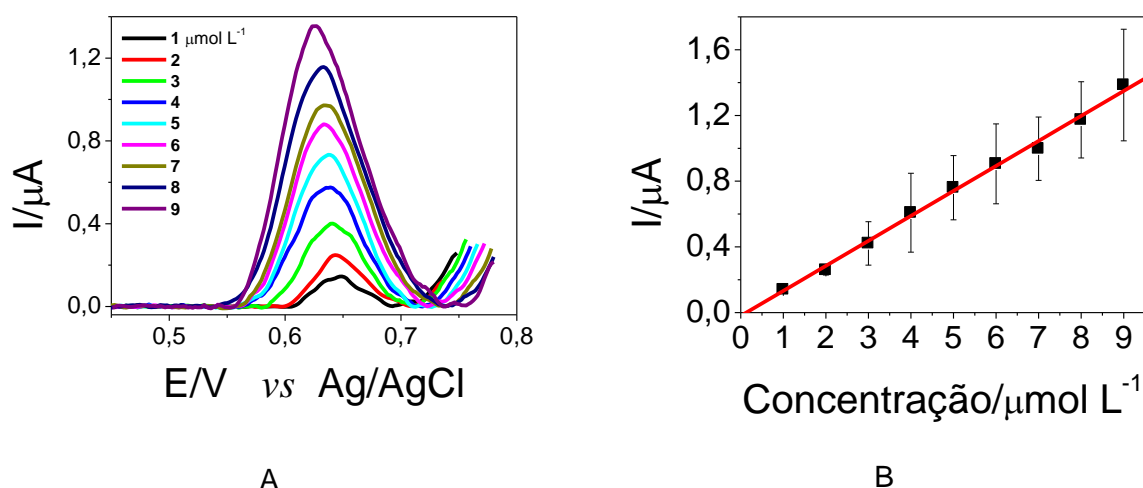
Assim como para o teste da modificação em voltametria cíclica, os voltamogramas de onda quadrada da variação de parâmetros apresentaram um deslocamento para regiões mais positivas sobre o eletrodo modificado quando comparados com o eletrodo sem modificação.

Estes três de parâmetros da voltametria de onda quadrada selecionados no estudo com o eletrodo modificado, Amplitude = 50 mV; Frequência = 250 Hz e Incremento = 2 mV, foram utilizados para a obtenção das curvas analíticas dos três hormônios em estudo.

4.5 Curva Analítica

Com os parâmetros da voltametria de onda quadrada definidos na secção 4.4.1 pôde-se construir a curva analítica, utilizando o eletrodo de carbono vítreo modificado em tampão BR, da estrona (Figura 35), estriol (Figura 36) e 17- α -etinilestradiol (Figura 37).

Figura 35: A) Voltamogramas de onda quadrada para a estrona sobre o eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono. B) Curva analítica da estrona. Tampão BR; pH 7,0; Amplitude = 50 mV; Frequência = 250 Hz; Incremento de varredura = 2 mV.



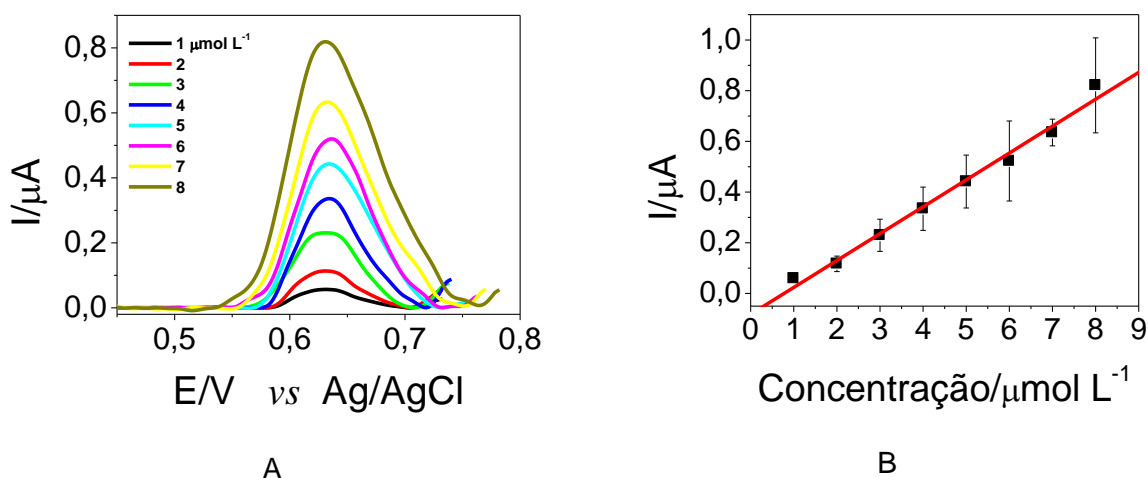
No intervalo de concentração de 1,0 a 9,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ observa-se um crescimento linear da intensidade da corrente de pico em função da concentração da estrona (Figura 35B), sendo a linearidade igual a 0,9981 e a sensibilidade igual a 0,1521 $\mu\text{A/ mol L}^{-1}$. Obteve-se o limite de detecção (LOD) de $1,17 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e o limite de quantificação (LOQ) de $3,92 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, limites calculados pelas equações (1) e (2) respectivamente⁽⁴⁸⁾.

$$LOD = \frac{3Sd}{b} (Eq1.)$$

$$LOQ = \frac{10Sd}{b} (Eq2.)$$

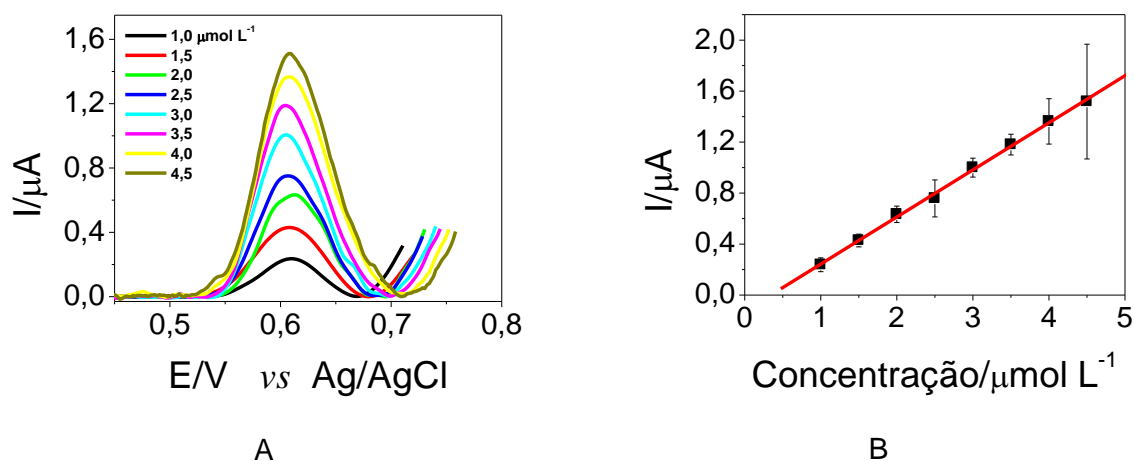
Sendo Sd o desvio padrão do branco e b é o coeficiente angular da curva analítica.

Figura 36: A) Voltamogramas de onda quadrada para o estriol sobre o GCE/MWCNT. B) Curva analítica do estriol. Tampão BR; pH 7,0; Amplitude = 50 mV; Frequência = 250 Hz; Incremento de varredura = 2 mV



Para o estriol, no intervalo de concentração de 1,0 a 8,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ observa-se um crescimento linear da intensidade da corrente de pico em função da concentração (Figura 36B), sendo a linearidade igual a 0,9935 e a sensibilidade igual a 0,1061 $\mu\text{A/ mol L}^{-1}$. Obteve-se o limite de detecção (LOD) de $1,12 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e o limite de quantificação (LOQ) de $3,74 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 37: A) Voltamogramas de onda quadrada para o 17- α -etinilestradiol sobre o GCE/MWCNT. B) Curva analítica do 17- α -etinilestradiol. Tampão BR; pH 7,0; Amplitude = 50 mV; Frequência = 250 Hz; Incremento de varredura = 2 mV.



A curva analítica do 17- α -etinilestradiol foi construída no intervalo de concentração de 1,0 a 4,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e pode-se observar o crescimento linear da intensidade de corrente de pico em função da concentração (Figura 37B), sendo a linearidade igual a 0,9989 e a sensibilidade igual a 0,3694 $\mu\text{A/ mol L}^{-1}$. Obteve-se o limite de detecção (LOD) de $1,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e o limite de quantificação (LOQ) de $3,34 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

Com os limites calculados possibilitou-se a comparação destes com outros estudos da literatura (Tabela 4), que utilizaram técnicas eletroanalíticas para a quantificação destes hormônios. Observa-se que os valores obtidos como método proposto se apresentam muito próximos a estudos semelhantes encontrados na literatura.

Tabela 4: Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para os hormônios em estudo, utilizando diferentes métodos eletroanalíticos.

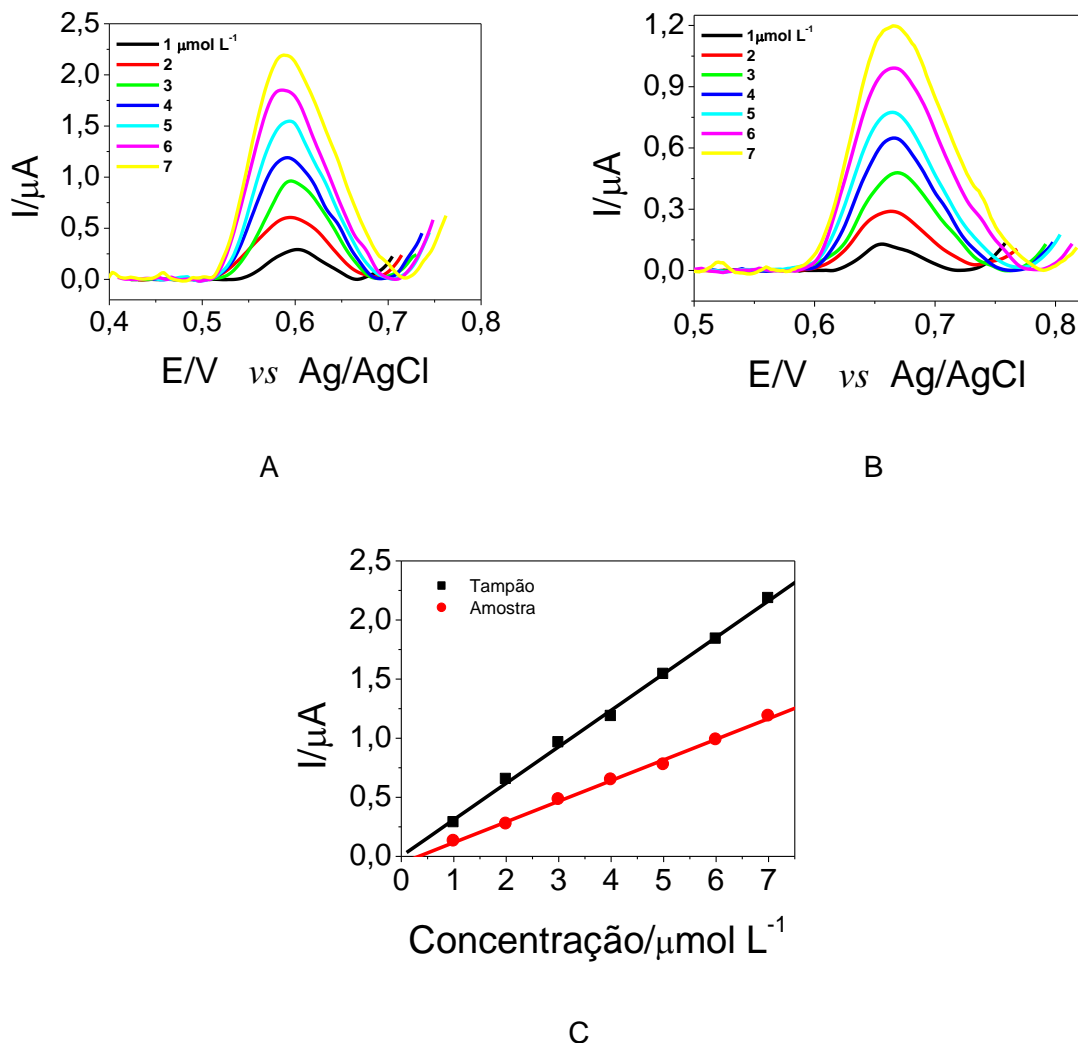
Composto	LOD	LOQ	Eletrodo	Técnica	Referência
Estrona	$1,17 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹	$3,92 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹	GCE/MWCNT	SWV	*
Estriol	$1,12 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹	$3,74 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹	GCE/MWCNT	SWV	*
17- α	$1,00 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹	$3,34 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹	GCE/MWCNT	SWV	*
Estrona	$1,00 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹	-	BDD	SWV	(47)
Estradiol	$1,00 \times 10^{-8}$ mol L ⁻¹	-	GCE/MWCNT	DPV	(29)
Estriol	$8,00 \times 10^{-8}$ mol L ⁻¹	-	DME	DPV	(49)
17- α	$9,00 \times 10^{-8}$ mol L ⁻¹	-	GCE/MWCNT-Chi	SWV	(31)

(*) Este trabalho

4.6 Avaliação da potencialidade da metodologia desenvolvida para determinação de estrona em água do mar

A avaliação da potencialidade do método proposto foi testada na determinação de estrona em água do mar. Esses estudos foram realizados utilizando a água do mar como eletrólito suporte, como o pH desta amostra estava em torno de 8,0, foi construída também uma curva analítica em tampão BR pH 8,0 para posterior comparação. Os voltamogramas obtidos para a estrona em tampão BR e na água do mar estão apresentados na Figura 38.

Figura 38: A) Voltamogramas de onda quadrada para a estrona em tampão BR 0,1 mol L⁻¹, pH 8,0 sobre o GCE/MWCNT. B) Voltamogramas de onda quadrada para a estrona em água do mar sobre o GCE/MWCNT. C) Curva analítica da estrona em tampão BR e em água do mar. Amplitude = 50 mV; Frequência = 250 Hz; Incremento de varredura = 2 mV.



Os limites de detecção (LOD), quantificação (LOQ) e sensibilidade das curvas estão discriminados na Tabela 5.

Tabela 5: Resultados obtidos das curvas analíticas para a estrona em tampão BR 0,1 mol L⁻¹ e em água do mar, utilizando o GCE/MWCNT.

Meio	Sensibilidade	Linearidade	LOD	LOQ
Tampão	0,3086	0,9988	$1,61 \times 10^{-7}$	$5,37 \times 10^{-7}$
Amostra	0,1748	0,9984	$2,38 \times 10^{-7}$	$7,93 \times 10^{-7}$

Os dados obtidos mostram um aumento nos limites LOD e LOQ nos dois testes em água do mar, observa-se ainda uma diminuição na sensibilidade do método, isso ocorre possivelmente devido à presença de interferentes na

amostra, que podem adsorver na superfície do eletrodo e/ou reagir com o próprio hormônio, afetando a sensibilidade do método.

A análise de variância (ANOVA) realizada entre as curvas (Tabela 6) apresentou o valor de F superior ao valor de F crítico, indicando que há variabilidade entre a amostra e o eletrólito suporte (Tampão BR), o valor de p obtido foi inferior a 5% mostrando grande confiabilidade nos resultados obtidos⁽⁵⁰⁾.

Tabela 6: ANOVA para as curvas obtidas no tampão BR e na amostra de água do mar para a estrona.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Linhas	3,275326	6	0,545888	12,83453	0,003379	4,283865714
Colunas	1,239218	1	1,239218	29,13564	0,001667	5,987377584
Erro	0,255196	6	0,042533			
Total	4,769741	13				

Sendo:

SQ – Variância total da fonte de variação

gl - graus de liberdade da fonte de variação

MQ - Média da variância da fonte de variação

F - Relação entre a variância entre as amostras e a variância dentro das amostras

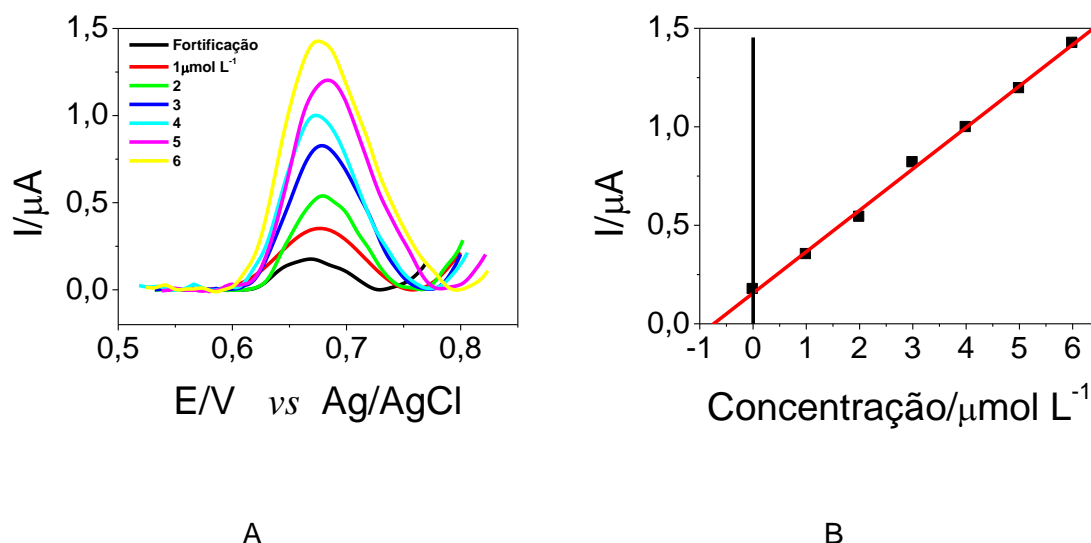
p - nível descritivo

F_{crítico} - Fator limite como critério indicador de diferença significativa entre as medidas

O teste t pareado foi realizado entre o tampão e a amostra, obteve-se um valor de t de 5,39, sendo o valor de t crítico de 2,45, indicando que a amostra bruta afeta o ensaio⁽⁵¹⁾.

Desta forma, para a avaliação da metodologia desenvolvida realizou-se o teste de recuperação da estrona em água do mar, empregando-se o método da adição de padrão. A amostra foi fortificada com estrona na concentração de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Os voltamogramas obtidos e a curva de recuperação encontram-se na Figura 39A e Figura 39B, respectivamente.

Figura 39: A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a determinação da estrona em água do mar. B) Curva analítica da estrona em amostra de água do mar. Amplitude = 50 mV; Frequência = 250 Hz; Incremento de varredura = 2 mV.



Os resultados do teste de recuperação estão discriminados na Tabela 7.

Tabela 7: Resultado da curva de recuperação da estrona em água do mar, utilizando o GCE/MWCNT.

Amostra	Adicionado (mol L ⁻¹)	Recuperado (mol L ⁻¹)	% de recuperação
Água do mar	1,0 x 10 ⁻⁶	0,74 x 10 ⁻⁶	74

A porcentagem de recuperação obtida para a estrona em água do mar, utilizando o método desenvolvido ficou em torno de 74%, valor este dentro do aceitável para o tipo de amostra e ordem de grandeza da concentração avaliada^(35,52,53).

5. Conclusões

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um sensor de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas para determinação dos hormônios estrona, estriol e 17- α -etinilestradiol.

Utilizando-se a voltametria cíclica (CV) efetuou-se o estudo da influencia do pH do meio no sinal analítico dos hormônios em estudo, obtendo-se em pH 7,0 voltamogramas com boa intensidade de sinal sendo os potenciais de oxidação para a estrona, estriol e 17- α -etinilestradiol de 0,59 V, 0,57V e 0,56 V, respectivamente, todos com características de processos irreversíveis controlados por adsorção.

A modificação utilizada propiciou um aumento na intensidade do sinal eletroquímico dos três hormônios e diminuiu o efeito da adsorção dos mesmos na superfície do eletrodo, se mostrando como um boa melhoria do sensor para a determinação analítica dos hormônios.

A técnica de voltametria de onda quadrada (SWV) foi utilizada para o desenvolvimento da metodologia de quantificação dos hormônios. As curvas analíticas da estrona e estriol foram obtidas no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ a $9,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, o 17- α -etinilestradiol apresentou forte adsorção na superfície do eletrodo, assim, a curva analítica deste hormônios foi obtida no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ a $4,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Os limites de detecção (LOD) para a estrona, estriol e 17- α -etinilestradiol foram de $1,17 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, $1,12 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e $1,00 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, respectivamente, e os limites de quantificação (LOQ) foram de $3,92 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, $3,74 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e $3,34 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, respectivamente, resultados condizentes com os observados na literatura em estudos semelhantes.

A potencialidade da aplicação do método em água do mar foi avaliada por meio do teste de recuperação empregando a técnica de adição de padrão. Obteve-se um percentual de recuperação de 74%, valor dentro do aceitável para a ordem de grandeza de concentração do analito.

A curva analítica em água do mar apresentou uma diminuição da sensibilidade em relação ao eletrólito suporte utilizado (tampão BR), possivelmente devido à presença de interferentes na amostra, visto que trata-se um meio de composição bastante complexa e passível da influencia do aporte de águas dos canais, rios e emissários. Entretanto os resultados obtidos indicam um potencial promissor da aplicação do método em água do mar bruta sem qualquer tratamento mais elaborado, passando somente por uma filtração simples, podendo ser efetuado em equipamento portátil no próprio local de coleta sem qualquer possibilidade de interferências em relação ao transporte, perda ou contaminação da amostra.

6. Referências

- 1 CETESB. Qualidade das Águas Interiores no Estado de São Paulo. 2017.
- 2 CETESB. Qualidade das Águas Costeiras no Estado de São Paulo. 2017.
- 3 CETESB Emissários Submarinos : Projeto, Avaliação de Impactos Ambientais e Monitoramento. 2007.
- 4 Imagens, G. Google Imagens. Disponível em: <https://www.google.com.br/img hp?hl=pt-PT>,
- 5 Mailler, R.; Gasperi, J.; et al. Removal of a wide range of emerging pollutants from wastewater treatment plant discharges by micro-grain activated carbon in fluidized bed as tertiary treatment at large pilot scale. *Science of the Total Environment*, v. 542, p. 983–996, 2016.
- 6 Estrada-Arriaga, E.B.; Cortés-Muñoz, J.E.; et al. Assessment of full-scale biological nutrient removal systems upgraded with physico-chemical processes for the removal of emerging pollutants present in wastewaters from Mexico. *Science of the Total Environment*, v. 571, p. 1172–1182, 2016.
- 7 Wang, W.; Ndungu, A.W.; et al. Monitoring of Endocrine-Disrupting Compounds in Surface Water and Sediments of the Three Gorges Reservoir Region, China. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 71, n. 4, p. 509–517, 2016.
- 8 D’Ascenzo, G.; Corcia, A. Di; et al. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *The Science of the Total Environment*, v. 302, p. 199–209, 2003.
- 9 Desbrow, C; Routledge, E. J; Brighty, G. C; Sumper, J.P.W. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening. *Environmental Science and Technology*, v. 32, p. 1549–1558, 1998.
- 10 Jobling, S; Nolan, M; Tyler, C. R; Brighty, G; Sumpert, J.P. Widespread Sexual Disruption in Wild Fish. *Environmental Science and Technology*, v. 32, n. 17, p. 2498–2506, 1998.
- 11 Pawlowski, S.; Ternes, T.; et al. Combined in Situ and in Vitro Assessment of the Estrogenic Activity of Sewage and Surface Water Samples. *Toxicological Sciences*, v. 75, p. 57–65, 2003.
- 12 Pawlowski, S.; Ternes, T.A.; et al. Estrogenicity of solid phase-extracted water samples from two municipal sewage treatment plant effluents and river Rhine water using the yeast estrogen screen. *Toxicology in Vitro*, v. 18, p. 129–138, 2004.
- 13 Svenson, A.; Allard, A.; et al. Removal of estrogenicity in Swedish municipal sewage treatment plants. *Water Research*, v. 37, p. 4433–4443, 2003.
- 14 Kumar, V.; Nakada, N.; et al. Chemosphere Rapid determination of free and conjugated estrogen in different water matrices by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Chemosphere*, v. 77, n. 10, p. 1440–1446, 2009.
- 15 Barceló, K.M.D. Determination of antifouling pesticides and their degradation products in marine sediments by means of ultrasonic extraction and HPLC – APCI – MS. *Analytical Chemistry*, v. 370, p. 940–945, 2001.
- 16 Parrella, A.; Lavorgna, M.; et al. Mutagenicity, genotoxicity, and estrogenic activity of river porewaters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 65, n. 3, p. 407–420, 2013.
- 17 Hamers, T.; Kamstra, J.H.; et al. The influence of extreme river discharge conditions on the quality of suspended particulate matter in Rivers Meuse and Rhine (The Netherlands). *Environmental Research*, v. 143, p. 241–255, 2015.

- Vilela, S. Estrona ou E1 – Para que serve o exame de sangue, resultados normais e aumentado para homens e mulheres.
- 19 Álvaro, L. ESTRÍOL - E3. Disponível em:
<http://www.alvaro.com.br/laboratorio/menu-exames/ESTRI>,
- 20 Saúde, D. Os 12 Melhores Anticoncepcionais Atualmente no Mercado.
- 21 Ngundi, M.M.; Sadik, O.A.; et al. First comparative reaction mechanisms of b-estradiol and selected environmental hormones in a redox environment. *Eletrochemistry Communications*, v. 5, p. 61–67, 2003.
- 22 Brocenschi, R.F.; Rocha-Filho, R.C.; et al. Comparative Electrochemical Response of Estrone at Glassy-Carbon, Nitrogen-Containing Tetrahedral Amorphous Carbon and Boron-Doped Diamond Thin-Film Electrodes. *Journal of Eletroanalytical Chemistry*, v. doi: [http:](http://), 2013.
- 23 Iijima, S. © 19 9 1 Nature Publishing Group. *Nature*, v. 354, p. 56–58, 1991.
- 24 Odom, T.W.; Huang, J. Atomic structure and electronic properties of single-walled carbon nanotubes. v. 391, n. January, p. 1997–1999, 1998.
- 25 Bondavalli, P.; Legagneux, P.; et al. Chemical Carbon nanotubes based transistors as gas sensors: State of the art and critical review. *Sensors and Actuators B*, v. 140, p. 304–318, 2009.
- 26 Sadegh, H.; Zare, K.; et al. Synthesis of MWCNT-COOH-Cysteamine composite and its application for dye removal. v. 215, p. 221–228, 2016.
- 27 Asadian, E.; Shahrokhian, S.; et al. Glassy carbon electrode modified with 3D graphene-carbon nanotube network for sensitive electrochemical determination of methotrexate. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 239, p. 617–627, 2017.
- 28 Perez, C.; Simões, F.R.; et al. Voltammetric determination of 17- α -ethinylestradiol hormone in supply dam using BDD electrode. *Journal of Solid State Electrochemistry*, v. 20, n. 9, p. 2471–2478, 2016.
- 29 Sun, Y.; Wu, K.; et al. Fabrication of a Multi-wall Carbon Nanotubes Modified Glassy Carbon Electrode and its Catalytic Effect on the Oxidation of Estradiol, Estrone and Estríol. *Microchimica Acta*, v. 142, n. 1–2, p. 49–53, 2003.
- 30 Lin, X.; Li, Y. A sensitive determination of estrogens with a Pt nano-clusters/multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 22, n. 2, p. 253–259, 2006.
- 31 Pavinatto, A.; Mercante, L.A.; et al. Layer-by-Layer assembled films of chitosan and multi-walled carbon nanotubes for the electrochemical detection of 17- α -ethinylestradiol. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 755, p. 215–220, 2015.
- 32 Sierra-Rosales, P.; Toledo-Neira, C.; et al. Electrochemical determination of food colorants in soft drinks using MWCNT-modified GCEs. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 240, p. 1257–1264, 2017.
- 33 Yang, C.; Sang, Q.; et al. Voltammetric determination of estrone based on the enhancement effect of surfactant and a MWNT film electrode. *Materials Science and Engineering C*, v. 29, n. 5, p. 1741–1745, 2009.
- 34 Palazzo, F.; Codognoto, L.; et al. Electrodes Based on Functionalized Carbon Nanotubes as Sensors to Determine Fenitrothion in Apple Tea Samples. *Sensor Letters*, v. 11, n. 12, p. 2310–2314, 2013.
- 35 Brito, N.M.; Amarante Junior, O.P. de.; et al. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS: ESTRATÉGIA E DISCUSSÃO. *Pesticidas: Revista de Eco toxicologia e Meio Ambiente*, p. 129–146, 2003.
- 36 Britton, H.T.S.; Robinson, R.A. Universal buffer solutions and the

- dissociation constant of veronal. *Journal of Chemical Society*, n. 1456, p. 1456–1462, 1931.
- 37 Earth, G. Google Earth. Disponível em: <https://www.google.com.br/intl/pt-BR/earth/>,
- 38 Sornalingam, K.; McDonagh, A.; et al. Photodegradation of estrogenic endocrine disrupting steroidal hormones in aqueous systems: Progress and future challenges. *Science of the Total Environment*, v. 550, p. 209–224, 2016.
- 39 Brett, M.A. *Eletroquímica - Princípios, Métodos*. 1996.
- 40 Nicholson, R.S.; Shain, I. Theory of Stationary Electrode Polarography: Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems. *Analytical chemistry*, v. 36, n. 4, p. 706–723, 1964.
- 41 Grosser JR, D.K. *Cyclic Voltammetry: Simulation and Analysis*. New York: Wiley, John & Sons, Incorporate., 1993.
- 42 Wu, M.; Snook, G.A.; et al. Electrochemical fabrication and capacitance of composite films of carbon nanotubes and polyaniline. *Journal of Materials Chemistry*, v. 15, p. 2297–2303, 2005.
- 43 Jiang, X.; Li, S.; et al. Determination of the acid values of edible oils via FTIR spectroscopy based on the O-H stretching band. *Food Chemistry*, v. 212, p. 585–589, 2016.
- 44 Souza, D.; Machado, S. A.S.; Avaca, L.A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. *Química Nova*, v. 26, n. 1, p. 81–89, 2003.
- 45 Osteryyoung. JG.; O'Dea, J. *Square-wave voltammetry*. New York: 1982.
- 46 Mirceski, V.; Komorsky-Lovric, S.; Lovric, M. *Square-wave voltammetry, theory and application*. Berlin: Springer, .
- 47 Brocenschi, R.F.; Rocha-Filho, R.C.; et al. DPV and SWV Determination of Estrone Using a Cathodically Pretreated Boron-Doped Diamond Electrode. *Electroanalysis*, v. 26, n. 7, p. 1588–1597, 2014.
- 48 Hubaux A., V.G. Decision and detection limits for linear calibration curves. *Analytical chemistry*, v. 42, p. 849–855, 1970.
- 49 Hu, S.; He, Q.; et al. Determination of trace amounts of estriol and estradiol by adsorptive cathodic stripping voltammetry. *Analyst*, v. 117, n. February, p. 3–6, 1992.
- 50 Anjos, A. dos. *Análise de Variância*. In: *Estatística II*. 2011, p. 109–118.
- 51 Conti, F. *Biometria Teste t para dados emparelhados*. Laboratório de Informática - ICB - UFPA, p. 1–10, 2009.
- 52 ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- 53 CONAMA Conselho Nacional do Meio Ambiente.